



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OVLIVNĚNÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI KYSELINY
HYALURONOVÉ ZMĚNOU FERMENTAČNÍHO PROCESU**

INFLUENCING OF MOLECULAR MASS OF HYALURONIC ACID BY FERMENTATION PROCESS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Wikarská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1124/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Monika Wikarská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Ovlivnění molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové změnou fermentačního procesu

Zadání bakalářské práce zadání:

Zadání:

1. Vypracování literární rešerše na téma „biotechnologická produkce kyseliny hyaluronové“.
2. Fermentace bakterie *Streptococcus zooepidemicus* za účelem produkce kyseliny hyaluronové.
3. Ověření vlivu přídavku hyaluronidáz do fermentačního média a optimalizace režimu přídavků.
4. Charakterizace výsledného produktu z pohledu výtěžku kyseliny hyaluronové a její molekulové hmotnosti.
5. Zpracování experimentálních dat, jejich analýza a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Monika Wikarská
student(ka)

doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Biologická funkcia kyseliny hyalurónovej (HA) – polysacharidu pozostávajúceho z opakujúcich sa jednotiek N-acetylglukózamínu a kyseliny glukurónovej – má mimoriadne široký a často protikladný charakter v závislosti na jej molekulovej hmotnosti (MW). Bakteriálna produkcia poskytuje HA o vysokej MW a čistote. Cieľom tejto práce bolo kontrolovať molekulovú hmotnosť vznikajúcej HA prídavkom hyaluronidáz počas fermentácie. Pokles MW vedie ku zníženiu viskozity média, čo je predpokladom pre zvýšenie výťažku. HA bola pripravená vsádzkovou kultiváciou mikroorganizmu *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. V priebehu fermentácie bol do bioreaktorov pridávaný enzým hyaluronát 4-glykánohydroláza (BTH) rôznej koncentrácie v rôznom čase kultivácie. Bol sledovaný výťažok HA, molekulová hmotnosť a polydisperzita HA metódou GPC-MALLS, dynamická viskozita produkčného média a koncentrácia zbytkovej glukózy. Bol dosiahnutý vznik nízko aj strednomolekulárnej HA. Prídavok 10 U (BTH) / g (HA) nemal výrazný vplyv na MW, teda funkciu HA, výrazný pokles viskozity však uľahčil purifikáciu produktu. Potenciálne zvýšenie výťažku HA nebolo dokázané z dôvodu veľmi nízkej koncentrácie zbytkovej glukózy a kvôli spôsobu zrážania HA pri vzniku HA o strednej a nízkej MW.

Abstract

The biological function of hyaluronic acid (HA) – the polysaccharide, which consists of repeating units of N-actylglucosamine and glucuronic acid – is extremely broad and often contradictory, depending on its molecular weight (MW). The bacterial production provides HA of high molecular weight and purity. The objective of this thesis is to control the molecular weight of produced HA by the addition of hyaluronidases during the process of fermentation, resulting in reduction of viscosity of the medium followed by increase of yield. Hyaluronic acid was prepared by batch fermentation of the microorganism *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. During the process of fermentation, the enzyme hyaluronate 4-glycanohydrolase (BTH) at various concentrations and different times of cultivation was added to bioreactors. The HA yield, the molecular weight and the polydispersity by the SEC-MALLS were monitored, together with the residual glucose concentration and the dynamic viscosity of the production medium. The formation of low and medium molecular weight HA was achieved. The addition of 10 U (BTH) / g (HA) had no significant effect on the molecular weight and therefore the HA function, but the corresponding drop of viscosity was noteworthy for the simplification of the product purification. Potential increase in HA yield was not confirmed because of the very low concentration of residual glucose and the method of precipitating low and medium MW HA.

Klíčové slová

Kyselina hyalurónová, *Streptococcus zooepidemicus*, Molekulová hmotnosť, 4-glykánohydroláza, BTH

Key words

Hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, Molecular weight, 4-glycanohydrolase, BTH

WIKARSKÁ, M. *Ovlivnění molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové změnou fermentačního procesu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 66 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu na tému „Ovplyvnenie molekulovej hmotnosti kyseliny hyalurónovej zmenou fermentačného procesu“ vypracovala samostatne a s použitím podkladov uvedených v zozname použitých zdrojov, ktoré som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

V Brne dňa 23.5.2017

.....
Monika Wikarská

PodĎakovanie

Za umožnenie výskumu ďakujem svojmu vedúcemu bakalárskej práce, doc. RNDr. Vladimírovi Velebnému, CSc.. Za odborné vedenie a ľudský prístup ďakujem Ing, Lukášovi Franke PhD. a za motiváciu a cenné rady prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc..

Za ochotu a ústretovosť ďakujem aj laborantkám vo firme Contipro, svojim drahým rodičom za podporu pri štúdiu a priateľom (K+T) pri písaní.

OBSAH

1 Úvod	11
Úvod	11
2 Teoretická časť	13
2.1 Kyselina hyalurónová (HA)	13
2.1.1 Biologický výskyt kyseliny hyalurónovej	13
2.1.2 Využitie kyseliny hyalurónovej	14
2.2 Molekulová hmotnosť kyseliny hyalurónovej	14
2.2.1 Vysokomolekulárna HA	15
2.2.2 Oligoméry HA	17
2.2.3 HA o strednej a nízkej molekulovej hmotnosti	17
2.3 Výroba kyseliny hyalurónovej	17
2.3.1 Extrakcia zo živočíšneho tkaniva	18
2.3.2 Enzymatická syntéza	19
2.4 Biotechnologická produkcia	20
2.5 Fermentácia baktérie <i>Streptococcus zooepidemicus</i> za účelom tvorby HA	21
2.5.1 Biosyntetická dráha kyseliny hyalurónovej	22
2.5.2 Mikroorganizmus a jeho nutričné požiadavky	23
2.5.3 Základné parametre fermentácie	23
2.5.4 Aerácia	25
2.5.5 Využitie suboptimálnych podmienok na zvýšenie produkcie HA	26
2.5.6 Miešanie	26
2.5.7 Purifikácia a získanie HA z produkčného média	26
2.6 Enzýmy hyaluronidázy	27
2.6.1 Zníženie viskozity fermentačného média	28
2.6.2 Prídavok hyaluronidáz počas fermentácie	28
2.7 Analýza molekulovej hmotnosti a polydisperzity pomocou SEC-MALLS	29
2.7.1 Molekulová hmotnosť	30
2.7.2 SEC-MALLS	31
3 Experimentálna časť	33
3.1 Materiál	33
3.1.1 Kultúra	33
3.1.2 Enzýmy	33
3.1.3 Chemikálie	33
3.1.4 Prístroje	34
3.2 Fermentácia <i>S. z.</i> : Kultivačné metódy	34
3.2.1 Inokulá na zaočkovanie fermentorov	34
3.2.2 Príprava fermentorov	35
3.2.3 Fermentácia	35
3.3 Fermentácia <i>S. z.</i> : Analytické metódy	35

3.3.1	Čistota kultúry	35
3.3.2	Optická hustota	36
3.3.3	Zbytková sacharóza	36
3.3.4	Molekulová hmotnosť	37
3.3.5	Dynamická viskozita	38
3.3.6	Gravimetrické stanovenie výťažku	38
3.3.7	Vplyv koncentrácie enzýmov na viskozitu média	39
3.3.8	Overenie zrážania HA o rôznych molekulových hmotnostiach	39
4	Výsledky a diskusia	41
4.1	Rýchlosť štiepenia enzýmu pri fermentačných podmienkach	41
4.2	Zmena produktu po prídavku desiatich jednotiek enzýmu	44
4.3	Vplyv vysokých prídavkov enzýmu na výsledný produkt	45
4.3.1	Molekulová hmotnosť	45
4.3.2	Prestup kyslíka	46
4.4	Výťažok HA	48
4.5	Polydisperezita HA a optimalizácia režimu prídavku enzýmu	50
5	Záver	53
	Zoznam použitých symbolov a skratiek	63
	Zoznam obrázkov	65
	Zoznam tabuliek	66

1 ÚVOD

Kyselina hyalurónová (HA), ktorá existuje vo forme polyaniónu označovaného ako hyaluronan, je lineárny polysacharid tvorený z opakujúcich sa jednotiek β -(1,3)-N-acetylglukózamínu a β -(1,4)-D-glukurónovej kyseliny (glukuronátu). Môže byť dlhá až niekoľko tisíc jednotiek. Ak nie je naviazaná na iné molekuly, viaže sa na vodu – vytvára veľmi viskózne gély, dokáže pohltiť až stonásobné množstvo kvapaliny.

V súčasnosti existujú dva komerčné procesy produkcie kyseliny hyalurónovej. Extrakcia z tkanív zvierat alebo aplikácia systému bakteriálnej expresie predovšetkým mikroorganizmami rodu *Streptococcus*. Dôležitým parametrom kvality komerčného produktu HA vzhľadom na jeho reologické vlastnosti a ovplyvňovanie fyziologických reakcií je molekulová hmotnosť. HA sa využíva v širokom spektre aplikácií v medicíne, potravinárstve a kozmetike.

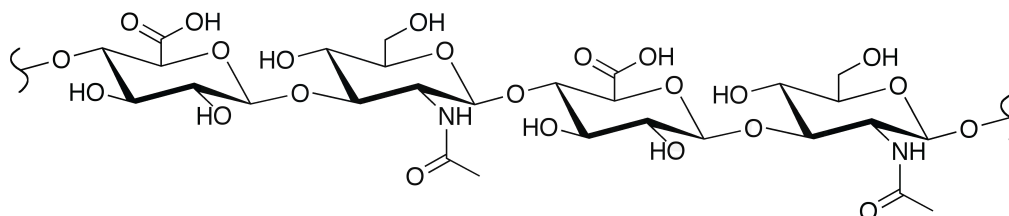
Oligosacharidy (< 10 kDa) stimulujú krvnú mikrocirkuláciu v pokožke, sú protizápalové a hydratačné. HA o nízkej molekulovej hmotnosti ($10 - 250$ kDa) stimuluje syntézu kolagénu a telu vlastnej HA. HA strednej molekulovej hmotnosti ($250 - 1000$ kDa) reguluje protizápalové procesy v pokožke a stimuluje intracelulárnu komunikáciu. Vysokomolekulová HA (> 1000 kDa) zlepšuje hydratáciu pokožky a obnovuje funkciu kožnej bariéry.

Bakteriálna produkcia poskytuje HA o vysokej molekulárnej hmotnosti a čistote. HA o nižšej molekulovej hmotnosti (aj oligosacharidy) je bežne vyrábaná kontrolovanou depolymerizáciou vysokomolekulárnej HA v čistej forme použitím fyzikálnych opatrení (teplota, tlak), ožarovania (elektrónový lúč, gama / mikrovlnné / UV žiarenie), pôsobením kyseliny, ozonolýzou, ultrazvukom, kovom katalyzovanou radikálovou oxidáciou a enzymatickou hydrolýzou hyaluronidázami.

Biotechnologická výroba HA patrí medzi vysokoviskózne aeróbne fermentácie, kedy je produkcia HA limitovaná prestupom kyslíka kvôli vysokej viskozite média. Viskozita média môže byť znížená degradáciou vysokomolekulárnej HA na nízkomolekulárnu prípravkom hyaluronidáz počas fermentácie, čo je vo výsledku predpokladom pre zvýšenie výťažku HA.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Kyselina hyalurónová (HA)



Obr. 2.1: Chemická štruktúra kyseliny hyalurónovej.

Polysacharid je tvorený z opakujúcich sa jednotiek β -(1,4)-D-glukurónovej kyseliny (glukuronátu) a β -(1,3)-N-acetyl-D-glukóзамínu [1].

Skelet molekuly hyalurónanu (Obrázok 2.1) je vo fyziologickom roztoku rigidný vďaka kombinácii štruktúry disacharidu, interných vodíkových mostíkov a interakcií s rozpúšťadlom. Axiálne atómy vodíka vytvárajú nepolárnu, relatívne hydrofóbnú plochu štruktúry skrutkovice. Tá je schopná zachytávať hmotnostne až tisíckrát viac vody v porovnaní s hmotnosťou vlákna. V roztoku je polymérne vlákno hyalurónanu zvinuté náhodne. Jednotlivé vlákna sú zamotané medzi sebou už pri veľmi nízkych koncentráciách, čo vedie ku vykazovaniu nezvyčajných reologických vlastností. Pri vyšších koncentráciách majú roztoky veľmi vysokú viskozitu, ktorá je závislá na tlaku. Pri 1% koncentrácii je roztok síce rôsolovitý, pod tlakom však môže byť nasatý otvorom injekčnej ihly. Vďaka tejto vlastnosti je HA nazývaná aj „pseudoplastický“ materiál. Nezvyčajné reologické vlastnosti roztokov hyalurónanu ich robia výbornými lubrikantmi. hyalurónan v tele oddeľuje väčšinu plôch tkanív, ktoré po sebe klúzu [2].

2.1.1 Biologický výskyt kyseliny hyalurónovej

V organizme sa HA nachádza vo forme soli – hyaluronátu (hyalurónanu) [2] a v tele 70kg človeka sa celkovo nachádza 15 g v rôznych tkanivách, polovica z toho v koži. HA je syntetizovaná ako vysokomolekulárny (HMW) polymér, ktorý sa v tkanive nachádza ako pericelulárna vrstva. HA môže byť prípadne uvoľnená z pericelulárnej matrice a začlenená ako integrálna súčasť modulu extracelulárnej matrix (ECM), alebo sa môže uvoľňovať v rozpustenej forme do tkanivového moku či krvného obehu. V každom prípade podlieha následnej degradácii a je odstránená lymfou [3]. Za homeostatických podmienok sa HA resyntetizuje veľmi rýchlo, denne sa degraduje na nízkomolekulárnu (LMW) HA až tretina z celkového množstva v tele [4]. Fragmentácia HA nastáva enzymatickým alebo neenzymatickým procesom. Enzymatické štiepenie HA pomocou hyaluronidáz zahŕňa hydrolýzu β -(1-4) väzieb v reťazci [3] HA. Okrem kože sa jej najvyššie koncentrácie nachádzajú v mäkkých spojivových tkanivách, pupočnej šnúre, synoviálnej tekutine a očnom sklovci. Významné množstvá HA sa tiež nachádzajú v pľúcach, obličkách, mozgu a vo svalovom tkanive. Primárne sa HA nachádza v extracelulárnej a pericelulárnej matrix, ale tiež sa vyskutojuje aj intracelulárne [2].

V kvapalných spojivových tkanivách (kĺbová synoviálna tekutina / očný sklovec) udržuje viskoelasticitu, zabezpečuje hydratáciu tkaniva, transport vody, supramolekulový zber proteoglykánov v extracelulárnej matrix a má ďalšie početné funkcie sprostredkované receptormi pri delení buniek v mitóze, pri migrácii, ale aj pri vývoji nádorov a zápalov [2].

2.1.2 Využitie kyseliny hyalurónovej

Kyselina hyalurónová má unikátne reologické, viskoelastické, hygroskopické a biokompatibilné vlastnosti a je jednoducho vstrebateľná tkanivami. Vďaka tomu sa v súčasnosti vyvíjajú mnohé biomedicínske, farmaceutické a kozmetické produkty, ktoré túto kyselinu obsahujú [2, 5]. Momentálne je HA používaná na zlepšenie hojenia a regenerácie chirurgických rán, na doplnenie kĺbovej tekutiny pri artritíde, taktiež aj v očnej chirurgii [2]. Za cieľom obnovenia elastických a viskózných vlastností synoviálnej tekutiny pre liečbu osteoartritídy kolien sú intra-artikulárne injekcie HA jednou z najpoužívanějších terapií [6]. V oftalmológii je HA bežne používaná na liečbu syndrómu suchého oka a v oftalmologickej chirurgii ako zariadenie na vytvorenie vysokoviskózných roztokov pri nízkych koncentráciách [6]. V poslednej dobe je HA skúmaná aj ako činidlo pre oftalmické, nazálne, pľúcne, parenterálne a topické podanie liečiva [2]. Na báze HA ako cielenej zložky boli preskúmané už početné systémy dodania liečiv ako sú nanokomplexy, nanočastice a konjugáty liečiv [7]. Veľmi rozšírený výskum HA je momentálne v nosičových aplikáciách pre liečivá proti rakovine. Tumorové bunky ich selektívne rozpoznávajú prostredníctvom expresie HA receptormi ako napríklad CD44 [6] (glykoproteín na povrchu bunky) [2] a RHAMM [8] (receptor pre HA sprostredkujúci mobilitu) [2]. Na tieto receptory sa dokáže naviazať špecificky a tým sa dosiahne cielená aplikácia liečiva do tumoru [7]. Vďaka vynikajúcej biokompatibilite a biodegradabilite býva HA často využívaná v biomedicíne vrátane tkanivového inžinierstva [8].

2.2 Molekulová hmotnosť kyseliny hyalurónovej

Dĺžka polyméru, a teda molekulová hmotnosť HA, hrá významnú rolu v interakciách s extracelulárnym matrixom, receptormi na povrchu buniek (vrátane receptoru CD44) a ovplyvňuje spôsob bunkovej odozvy na extracelulárne podnety [3]. Napriek svojej pomerne jednoduchej primárnej štruktúre má HA mimoriadne široký a často protikladný charakter biologickej aktivity v závislosti na jej molekulovej hmotnosti [9]. Patologický význam rôznych veľkostí HA *in vivo* je zobrazený na obrázku 2.2.

Po preskúmaní literatúry sa ukázalo, že neexistuje presná špecifikácia molekulových hmotností, ktorými by boli dané rozmedzia pre HMW-, MMW-, LMW- a oligo-HA. Pre lepšie porozumenie a porovnanie roly polymérov HA rozličnej veľkosti v rôznych biologických nastaveniach kategorizujeme formy MW HA takto: HMW-HA (> 1000 kDa), MMW-HA (250-1000 kDa), LMW-HA (10-250 kDa) a oligo-HA (< 10 kDa) [3]. Tieto skupiny nie sú v žiadnom prípade zreteľne rozdelené; pri mnohých funkciách je MW HA polydisperzná, zahŕňa viac ako jednu veľkostnú kategóriu. Na rozdiel od toho sú špecifické vlastnosti HA v určitých prípadoch spojené s úzko definovaným spektrom jej MW [10].

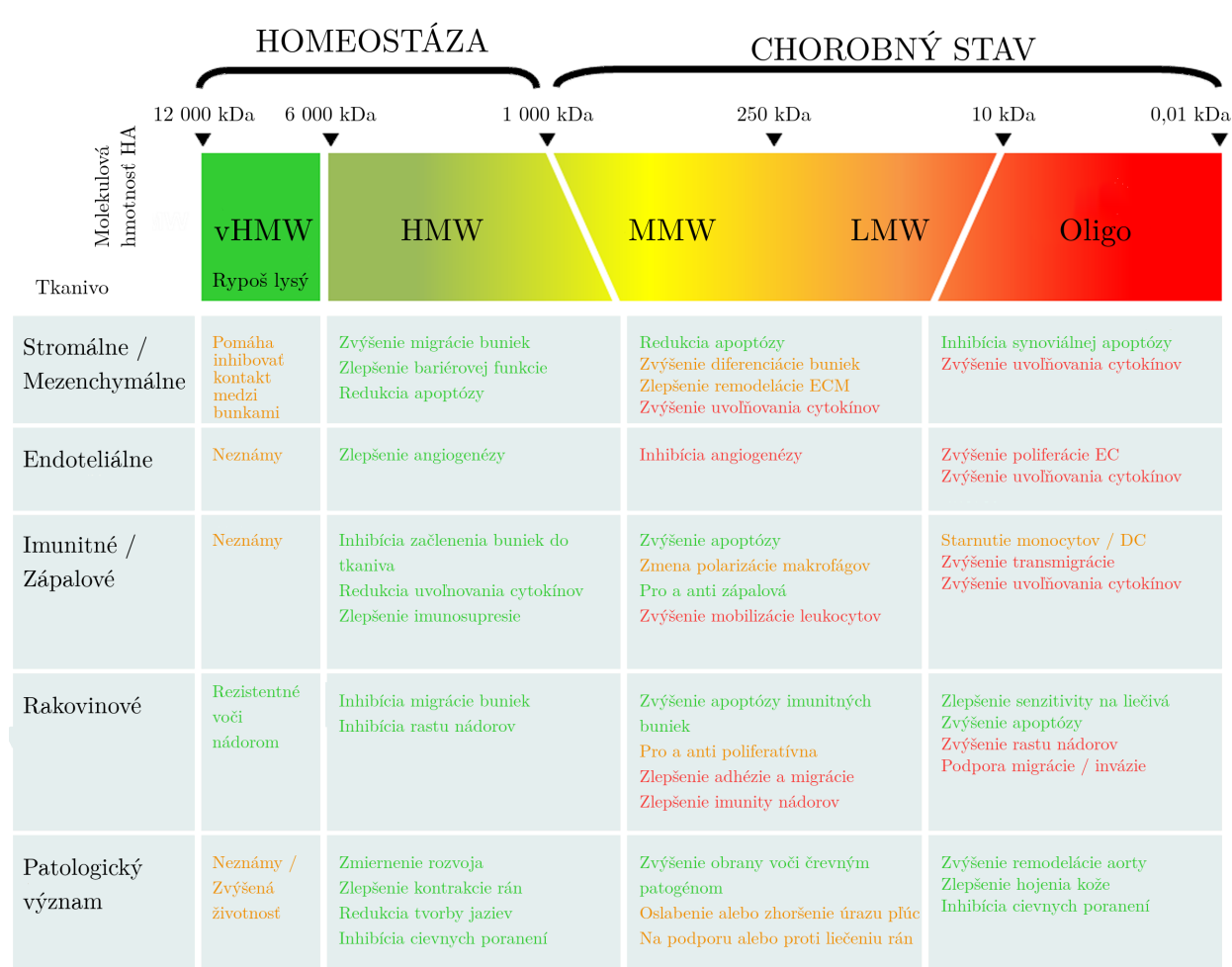
V najbežnejšej homeostatickej natívnej forme existuje polymér HA ako HMW molekula, takmer vo všetkých tkanivách sa nachádza HA o molekulovej hmotnosti viac ako 1 000 kDa. Malé, ale potenciálne významné rozdiely sú v závislosti na type tkaniva a druhu organizmu (1 000 – 7 000 kDa). Zvýšená fragmentácia HA je zrejmá najmä pri patologických stavoch vyskytujúcich sa pri zápalových a fibrotických ochoreniach. Znakom mnohých týchto stavov je zvýšená produkcia hyaluronan syntáz (HASs) a zvýšená koncentrácia HA. HMW-HA je *in vivo* degradovaná enzýmami hyaluronidázami (Hyal), ktoré hydrolyzujú reťazce HA, čím vznikajú medziprodukty – fragmenty MMW / LMW HA. Za určitých patologických podmienok sa rozsah fragmentácie HA výrazne zvýši, čím nastávajú zmeny v distribúcii a biologickej aktivite produktov HA (napríklad nahromadenie oligomérov HA). Tieto bioaktívne fragmenty HA spoločne slúžia na interakciu s bunkami a ovplyvňujú správanie inými spôsobmi ako HMW-HA.

HA o nižšej molekulovej hmotnosti (aj oligosacharidy) je bežne vyrábaná kontrolovanou depolymerizáciou vysokomolekulárnej HA v čistej forme použitím fyzikálnych opatrení (teplota, tlak), ožarovania (elektrónový lúč, gama / mikrovlnné / UV žiarenie), pôsobením kyseliny, ozonolýzou, ultrazvukom, kovom katalyzovanou radikálovou oxidáciou a enzymatickou hydrolýzou hyaluronidázami [4, 11].

2.2.1 Vysokomolekulárna HA (HMW-HA)

Ako už bolo zmienené, HA sa vo svojom prirodzenom stave nachádza vo forme HMW (> 1000 kDa) a ovplyvňuje bežné homeostatické funkcie rôznymi spôsobmi. HMW-HA má schopnosť zachytávať veľké množstvá vody, čo je skvelou biofyzikálnou vlastnosťou pre lubrikáciu, hydratáciu alebo vyplnenie tkanív ako sú kĺby a spojivové tkanivá [12, 13]. Jej hydrofilné atribúty tiež umožňujú pôsobiť ako molekulové sito a ovplyvňovať rýchlosti absorpcie tekutín z tkaniva a zmeny v ich koncentrácii [14]. Biomechanické vlastnosti HMW-HA sú evidentné už počas vývoja, zrelé embryo je obklopené mäkkou hydratovanou matricou bohatou na HMW-HA, mäkké matrice sú považované za inhibítory bunkovej adhézie a proliferácie. Mikroprostredie bohaté na HA uľahčuje rast a vývoj tkanív (neurónov, končatín, krvných ciev a srdca). Prítomnosť HMW-HA je kľúčová pre zdravú embryogenézu, cielená delícia hyaluronan syntázy HAS2 vedie k embryonálnej letalite kvôli abnormálnemu vývoju srdca [3]. Tieto zvláštne biomechanické vlastnosti HA v mäkkých tkanivách boli nedávno potvrdené *in vitro*, kde mäkké substráty bohaté na HA podporovali šírenie buniek, ich priľnavosť, vznik stresových vlákien a celkovú normálnu bunkovú funkciu na rozdiel od substrátov bohatých na kolagén s rovnakým stupňom tuhosti, ktoré HA neobsahovali [15]. To možno vysvetľuje spôsob, akým embryonálne bunky dokážu počas vývoja priľnúť, proliferovať a diferencovať sa v mäkkých podmienkach. Táto hypotéza sa môže rozšíriť aj na hojenie rán, keďže jedným z prvých javov pri tvorbe granulačného tkaniva (napríklad pri kožných poraneniach) je nahromadenie HA v mäkkej fibrínovej matrici.

V *in vitro* modeloch na hojenie rán zlepšilo začlenenie HMW-HA do kolagénových gélov jeho kontrakciu, napomáhalo rozširovaniu buniek hladkého svalstva ciev, či perikulárnej akumulácii kolagénových vlákien prostredníctvom HA receptora CD44 [16]. HMW-HA poskytuje priaznivé mikroprostredie pre adhéziu a proliferáciu transplantovaných buniek, čo vedie k zníženému zápalu a apoptóze kardiomyocytov, ako aj k zvýšenej



Obr. 2.2: Zhrnutie patologického významu veľkostí HA *in vivo*.

Zelený text zdôrazňuje pozitívnu rolu pre každú MW HA vo funkcii a obnovení tkanív, naopak červený text poukazuje na jej negatívny vplyv. Protichodné alebo nejasné odozvy tkaniva sú zobrazené oranžovou farbou [3].

angiogenéze a kardiálnej výkonnosti [17]. V zrelej pokožke zlepšila HMW-HA funkciu kožnej bariéry prostredníctvom mechanizmov závislých od receptora CD44 [18]. HMW-HA zohráva ochrannú funkciu v tumorigenéze. V modele ľudského kolónového karcinómu v myšiach po chemoterapii inhibovala liečba pomocou HMW-HA opätovný rast nádorov [19]. Naopak, nadmerná expresia HAS2 (ktorá s najvyššou pravdepodobnosťou vedie ku akumulácii HMW-HA) umožňovala návrat nádorových buniek do stavu kmeňových buniek, čím podporovala prežitie nádoru [20]. Nie je však dokázané, či to bolo priamo kvôli signalizácii HMW-HA, alebo fragmentami, na ktoré bola akumulovaná HMW-HA degradovaná [21].

2.2.2 Oligoméry HA (oligo-HA)

Mnohé účinky vyvolané oligo-HA v patologických stavoch sa vyskytujú prostredníctvom signálu sprostredkovaného receptorom v imunitných bunkách, čo vedie buď k podpore alebo predĺženiu procesu zápalu [21]. Vznik zápalu a teda aj istého množstva oligo-HA je normálnou súčasťou reakcie tela na zranenie. Z toho vyplýva, že prebytok oligo-HA má na hojenie škodlivý vplyv spôsobený dlhotrvajúcim zápalom a podporou progresie ochorenia. Napriek tomu môže oligo-HA uľahčiť regeneráciu a hojenie tkaniva – rezidentných mezenchymálnych buniek. Trvalé dodávanie oligo-HA nanočastíc zvýšilo syntézu elastínu a uľahčilo remodeláciu aorty po úraze potkanov [22]. Modely hojenia rán tiež ukázali, že podávanie oligo-HA urýchľuje proces hojenia nahromadením makrofágov, podporou uzatvárania rán [23] a zvýšením angiogenézy a lymfogenézy [24]. Topická aplikácia oligo-HA podporuje proliferáciu keratínocytov a zväčšuje hrúbku kože a bariérovú funkciu CD44-dependentným spôsobom [18]. Súčasná literatúra je rozdelená podľa toho, či oligo-HA (rovnako ako LMW – MMW HA) podporuje, alebo potláča rast nádoru metastáz. Oligo-HA má široké spektrum rôznorodých účinkov na nádory v porovnaní s účinkami, ktoré má na netransformované bunkové typy v iných patologických podmienkach [25].

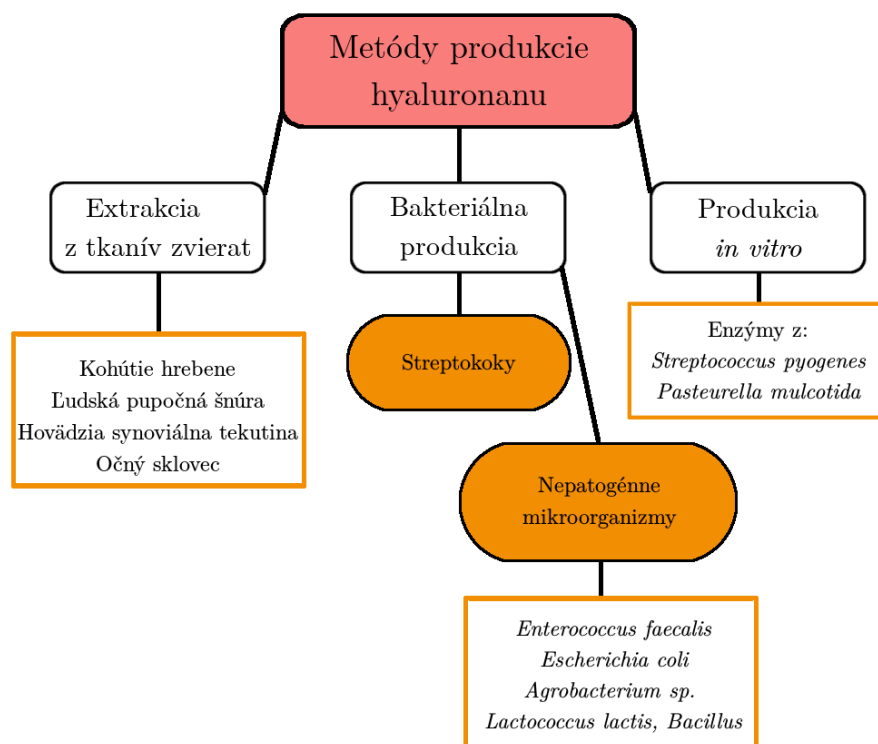
2.2.3 HA o strednej (MMW-HA) a nízkej molekulovej hmotnosti (LMW-HA)

Fragmenty LMW-HA a MMW-HA sú často detekované ako polydisperzné frakcie s prekrývajúcimi sa distribúciami molekulových hmotností. Môžu byť považované za medziprodukty a vznikajú kvôli čiastočnej fragmentácii pri rôznych koncentráciách hyaluronidáz a reaktívnych foriem kyslíka alebo dusíka, ale aj kvôli rozdielnej dostupnosti štiepných miest HA. Je tiež pravdepodobné, že tieto frakcie obsahujú stále vznikajúcu HA, ktorá ešte nedosiahla svoju plnú dĺžku. Vzhľadom na to sa funkcie MMW-HA a LMW-HA prekrývajú buď s HMW-HA alebo s oligo-HA [26].

V nádorovom mikroprostredí má LMW – MMW HA potenciál ovplyvniť rakovinové a stromálne bunky. LMW-HA uľahčuje adhéziu a migráciu nádorových buniek a podporuje progresiu nádoru aktiváciou proliferácie buniek [27]. Avšak, podobne ako v prípade oligo-HA v nádorovom mikroprostredí, aj LMW – MMW HA môže rast niektorých nádorov inhibovať [28].

2.3 Výroba kyseliny hyalurónovej

Poznáme tri spôsoby výroby kyseliny hyalurónovej (Obr. 2.3), ale iba dva z toho sú aplikované komerčne. Enzymatickou syntézou je možné vyrobiť presne definovanú dĺžku polymérov bez rizika kontaminácie, ale kvôli finančnej náročnosti sa nepoužíva komerčne. Extrakcia z tkanív zvierat je energeticky náročná na purifikáciu, riskuje sa degradácia HA endogénnymi hyaluronidázami a výťažky sú veľmi nízke. Aplikácia systému bakteriálnej expresie predovšetkým mikroorganizmami rodu *Streptococcus* sa za posledné dekády stala veľmi prepracovanou technológiou výroby [4].



Obr. 2.3: Metódy produkcie hyalurónanu [4].

2.3.1 Extrakcia zo živočíšneho tkaniva

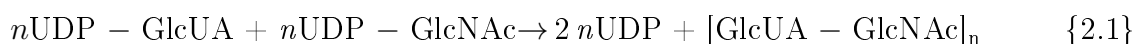
Ako v každej produkcii terapeutických zlúčenín zo živočíšneho zdroja, aj v tomto prípade bolo potrebné čeliť kontaminácii proteínmi a vírusmi, čo môže byť minimalizované použitím materiálu zo zdravých zvierat a rozsiahlou purifikáciou [4]. Napriek výbornej rozpustnosti HA vo vode je extrakcia vysoko čistej HA veľmi náročná, pretože sa v tkanive nachádza s mnohými ďalšími biopolymérmi vrátane proteoglykánov [29]. Metódy uvoľňovania HA z týchto komplexov zahŕňajú použitie proteolytických enzýmov (napr. papaín, pepsín, pronázu a trypsín), zrážanie iónovými pármami, organickými rozpúšťadlami a zrážanie bez rozpúšťadiel, použitie detergentov a ďalšie [30]. Produkty degradácie a ďalšie kontaminanty bývajú odstraňované ultrafiltráciou a chromatograficky, mikrobiálne bunky sa ešte pred zrážaním, sušením a ďalšou úpravou odstraňujú sterilnou filtráciou. Napriek rozsiahlej purifikácii môže byť živočíšny hyalurónan kontaminovaný proteínmi a nukleovými kyselinami, obsah kontaminantov sa líši podľa typu použitého tkaniva. Produkt môže byť infikovaný aj vírusovou infekciou, (napríklad bovinou spongiformnou encefalopatiou) o to väčší dôraz sa na purifikáciu kladie. HA farmaceutickej kvality vyrobená extrakciou z tkanív zvierat je na trhu dostupná od roku 1979 [4], kedy E. A. Balasz vyvinul efektívny spôsob izolácie a purifikácie HA z kohútich hrebeňov a ľudskej pupočnej šnúry [31]. Živočíšny hyalurónan je stále veľmi dôležitým zdrojom pre industriálnu výrobu HA, no obavy z virálnej a proteínovej kontaminácie spôsobili zvýšený záujem o biotechnologickú produkciu hyalurónanu. Najdostupnejšími zdrojmi na výrobu HA s vysokou molekulovou hmotnosťou vo veľkom merítku sú kohútie hrebene (1 200 kDa), ľudská pupočná šnúra (341 kDa), z hovädzieho dobytku sa získava zo synoviálnej tekutiny (1 400 kDa) a očného sklovca (77 – 1 700 kDa) [4]. V poslednej dobe boli vyvinuté spôsoby získania HA aj

z ďalších odpadových biologických tkanív. Extrakcia hyalurónanu z očí rýb poskytla HA o molekulovej hmotnosti 1 600 – 2 000 kDa a dosiahla čistotu produktu viac ako 99 %, aj keď výťažky tejto metódy sa stále radia medzi najnižšie [32]. Ďalším skúmaným zdrojom HA sú vaječné škrupiny, ktoré obsahujú iba 0,5 hm.% HA. Z tohto zdroja bola získaná HA o molekulovej hmotnosti približne 125 kDa [33].

2.3.2 Enzymatická syntéza

Rekombinantný enzým mikroorganizmov rodu *Pasteurella* (pmHAS), ktorý sa radí medzi hyalurónan syntázy triedy II, má niekoľko jedinečných vlastností, ktoré umožňujú chemoenzymatickú syntézu požadovaných krátkych oligosacharidov. Na rozdiel od neho sú všetky známe syntázy HA triedy I (streptokokové, vírusové a vertebrálne) pre enzymatickú syntézu relatívne nevhodné. Jedine enzým pmHAS dokáže predĺžiť exogénne dodávané oligosacharidy *in vitro*. Trieda I HAS ešte nebola preskúmaná tak dobre ako pmHAS [34].

Bola popísaná nová metodológia chemoenzymatickej syntézy na prípravu požadovaných monodisperzných reťazcov HA o akejkolvek molekulovej hmotnosti. Katalyzátormi syntézy boli v tomto prípade rekombinantné deriváty enzýmov hyalurónan syntáz katalyzujúcich polymerizáciu polysacharidu HA. Prirodzene sa vyskytujúce HA-syntázy sú glykozyltransferázy s dvojakou funkciou, ktoré pridávajú dva rozdielne cukry – GlcUA (β -D-glukurónová kyselina) a GlcNAc (N-acetyl- β -D-glukózamín) na vytvorenie polymérneho reťazca, ako je uvedené v reakcii 2.1.



Naproti tomu prenáša veľká väčšina ostatných známych glykozyltransferáz na akceptorovú molekulu len jeden typ monosacharidu. Boli identifikované a molekulárne klonované rôzne druhy HA-syntáz zo stavovcov, gram-pozitívnych baktérií rodu *Streptococcus* skupiny A a C a gram-negatívnych baktérií *Pasteurella multocida* typov A. HA-syntázy prenášajú cukrové prekursor (Reakcia 2.1) na vytvorenie polymérov o dĺžke približne 1-100 monosacharidov *in vitro*, čo odpovedá molekulovej hmotnosti 10-1 000 kDa. Natívna forma známych HA-syntáz je nevhodná na výrobu krátkych oligosacharidov, pretože je príliš ťažké presne a reprodukovateľne regulovať enzýmovú aktivitu kinetickými prostriedkami ako sú zníženie koncentrácie substrátu, teploty a / alebo reakčného času [34].

HA-syntáza z mikroorganizmu *Pasteurella*, pmHAS, postupne pridáva jednotlivé monosacharidy k neredukujúcemu zakončeniu narastajúceho reťazca HA. Tento enzým obsahuje vo svojej štruktúre polypeptidu dve nezávislé miesta pre väzbu polyméru, teda v každej doméne transferázy jednu. Poškodenie jedného aktívneho miesta žiadnym spôsobom neovplyvní aktivitu enzýmu na opačnej strane reťazca. Preto reakcie 2.2 a 2.3 prebiehajú samostatne na každom konci polyméru. Najdôležitejšími parametrami syntézy sú pH (pri extrémnych hodnotách môžu enzýmy prestať pracovať) a pomer enzým / substrát, tento spôsob prípravy prešiel značnou optimalizáciou podmienok [35].



Cena UDP-cukrových prekursorov používaných v chemoenzymatickej syntéze bola kedysi neprekonateľnou bariérou, v posledných rokoch sa však veľmi významne znížila. Bakteriálne rekombinantné systémy produkujú kilogramové množstvá týchto cukrov a sú relatívne finančne dostupné [34].

2.4 Biotechnologická produkcia

Vzhľadom na to, že HA produkovaná živočíchmi aj baktériami je identická, HA produkovaná biotechnologicky nie je imunogénna, čím sa stáva vhodným zdrojom farmaceutického hyalurónanu [4]. Syntéza kyseliny hyalurónovej je jedinečný a vysoko kontrolovaný bunkový proces. Na rozdiel od väčšiny glykózaminoglykánov, ktoré sú vytvárané v Golgiho aparáte, kyselina hyalurónová je syntetizovaná integrálnymi membránovými proteínmi – hyalurónan syntázami [42]. Extrakcia HA z mikrobiálneho fermentačného média je proces jednoduchší ako extrakcia z tkanív zvierat a dosahuje vysoké výťažky. Ďalšou významnou výhodou mikrobiálnej produkcie HA je to, že mikrobiálne bunky môžu byť fyziologicky a / alebo metabolicky prispôsobené na produkciu vyššieho množstva HA s vysokou molekulovou hmotnosťou. Preto je biotechnologická produkcia HA streptokokmi alebo rekombinantnými mikroorganizmami obsahujúcimi potrebnú hyalurónan syntázu v dnešnej dobe stále uprednostňovanejšia. Produkcia HA bola identifikovaná v niekoľkých rodoch mikroorganizmov [4]. Niektoré z nich sú označené ako GRAS (Všeobecne považované za bezpečné). Ide konkrétne o rekombinantné kmene *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium* a *Lactococcus lactis* [36].

Lactococcus lactis je bežne spájaný s potravinárskym priemyslom a mliečnymi výrobkami, syrom alebo kyslou kapustou. Fenotypovo ide o grampozitívnu sférickú homolaktátovú nesporelujúcu fakultatívne anaeróbnu baktériu so stovkami kmeňov a biovariánt [37]. Niekoľko mutantov mikroorganizmu *Lactococcus lactis* bolo metabolicky pozmenených aj na výrobu HA. Tento kmeň je atraktívnou alternatívou na výrobu HA hlavne vďaka jeho podrobne preštudovanému genómu a širokému spektru spôsobov genetickej manipulácie. Nevýhodou tohto kmeňa je vysoká produkcia kyseliny mliečnej, ktorou je limitovaná tvorba HA. Takmer 70 % toku uhlíkatého zdroja prúdi k výrobe laktátu. Cieľom momentálne prebiehajúcich štúdií je preskúmanie produkcie HA v mutantných kmeňoch rekombinantného *Lactococcus lactis* obsahujúcich laktátdehydrogenázu (ldh) a heterológne gény hasABC a hasABD zo *S. zooepidemicus*. Koncentrácia výťažku HA v produkčnom médiu pre tento kmeň bola zvýšená zo štandardných 0,2-0,9 g/l, až na 3,3 g/l [36].

Prvé použitie *E. coli* na produkciu HA bolo len v záujme zistenia funkcie génu kódujúceho tvorbu hyalurónan syntázy. Tým bol potvrdený predpoklad, že v prípade prítomnosti oboch cukrových prekursorov je na biosyntézu HA potrebný jedine enzým hasA. Tento gén pochádzal zo *S. pyogenes* skupiny A. Neskôr sa zistila možnosť produkcie ľudskej HA rekombinantnou *E. coli* [38].

Bacillus subtilis je grampozitívny sporujúci mikroorganizmus pochádzajúci z pôdy a vody a je asociovaný s rastlinami. Je jedným z najširšie využívaných mikroorganizmov genetickeho inžinierstva. Táto baktéria je využívaná na výrobu liečiv v dôsledku jej dobre charakterizovanej produkcie sekundárnych metabolitov, ktoré môžu byť použité ako antimikrobiálne činidlá a povrchovo aktívne látky [38], okrem toho, že je významným

výrobcom enzýmov ako proteázy a α -amylázy, aminokyselín a vitamínov. Tento mikroorganizmus je schopný vylučovania veľkého množstva produktov, čo svedčí o jeho vysoko rozvinutej biosyntetickej kapacite. Jeho rast v priemyselných fermentoroch je veľmi ekonomický [39]. Použitie kmeňa *B. subtilis* je vynikajúcou možnosťou produkcie HA, pretože tiež patrí do skupiny GRAS. Najnovšie vyvinutý kmeň obsahuje gén pre HA syntázu z *P. multocida* a operóny pre enzýmy spojené so syntézou UDP-cukrových prekursorov. Tento kmeň dosiahol produkciu HA až 6,8 g/l s molekulovou hmotnosťou 4,5 MDa [38].

Kmeň *Agrobacterium* ATCC31749 je alfa proteobaktéria čeľade Rhizobiaceae, na rozdiel od iných druhov tejto čeľade nie je asociovaný s rastlinami [40]. Je známy ako producent polysacharidu kurdlanu, čo dokazuje jeho prirodzenú schopnosť syntetizovať cukrový nukleotidový prekursor, UDP-glukózu. Štúdie produkcie HA s použitím *Agrobacterium* ako hostiteľa však majú isté obmedzenia. Boli preskúmané tri hostiteľské kmene pre syntézu HA prostredníctvom expresie génu pmHas z *P. multocida*. Najvyšší pozorovaný výťažok bol o koncentrácii 3,0 g/l a molekulová hmotnosť HA vyrobenej mikroorganizmom *Agrobacterium* sp. LTU261 bola približne 1,3-krát väčšia ako pri produkcii streptokokom [38].

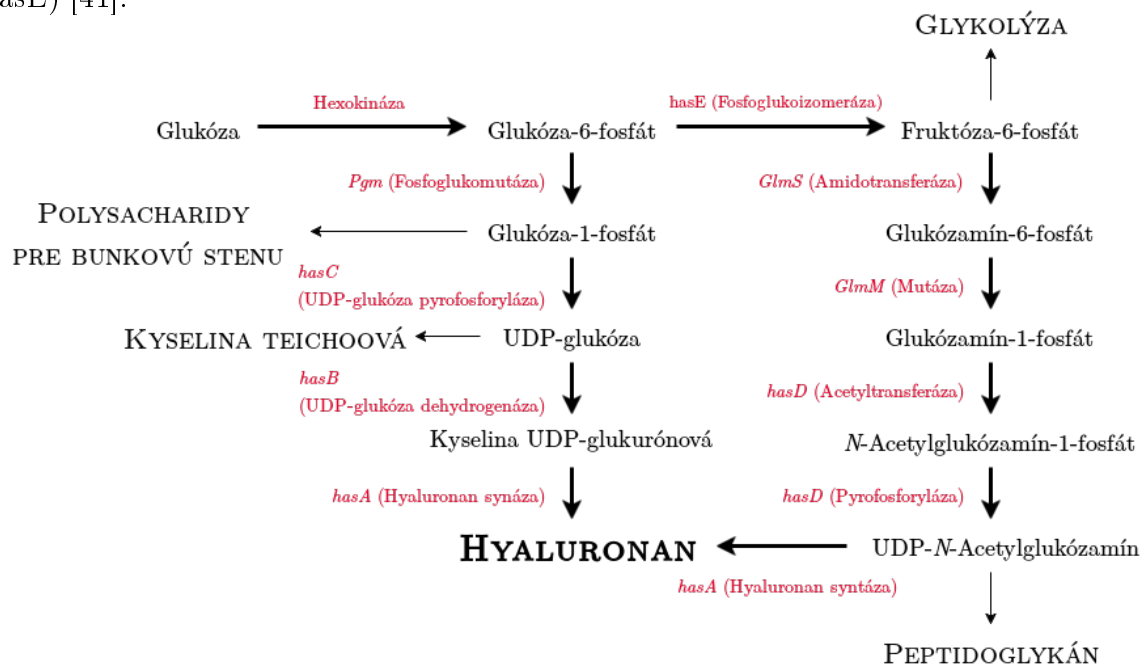
Baktéria *Enterococcus faecalis* je grampozitívny kok s prirodzeným výskytom v ľudskom tele v ústnej dutine a črevách. V literatúre existuje iba niekoľko štúdií zahŕňajúcich *E. faecalis* ako producenta HA. To môže byť spôsobené celkovo nízkym získaným výťažkom v porovnaní s inými mikroorganizmami. De Angelis et al. [34] uviedol, že po zavedení aspoň dvoch streptokokálnych proteínov do akapsulárneho *E. faecalis* by bola syntéza HA možná. Po inkorporácii operónu hasA bol *E. faecalis* schopný z 20 g/l glukózy syntetizovať 0,69 g/l HA [38].

2.5 Fermentácia baktérie *Streptococcus zooepidemicus* za účelom tvorby HA

Streptokoky sú nesporulujúce nepohyblivé baktérie, ktoré majú pod mikroskopom malý guľovitý tvar. Rastú obvykle ako diplokoky alebo tvoria reťazce obklopené rozsiahlou extracelulárnou kapsulou, ktorá je typicky jeden až trikrát väčšia ako priemer jednej bunky [30]. V mnohých mikroorganizmoch rodu *Streptococcus* typu A a C sa HA tvorí okolo bunky ako mukózna kapsula, ktorá im pomáha vyhnúť sa rozpoznaniu imunitným systémom hostiteľa. V streptokoku je HA produkovaná ako sekundárny metabolit a jej produkcia je ovplyvnená genetickými aj nutričnými faktormi [41] a podmienkami biosyntézy. Niektoré mikroorganizmy môžu produkovať hyaluronidázy – extracelulárne enzýmy, ktoré hydrolyzujú vzniknutý extracelulárny polysacharid, čo vedie k zníženiu koncentrácie aj molekulovej hmotnosti produktu. Boli implementované rôzne postupy, ktoré viedli ku zlepšeniu kmeňov na získanie kolónií bez hyaluronidáz a β -hemolytickej aktivity. Produkcia hyalurónanu môže byť ovplyvnená aj podmienkami fermentácie ako zloženie média, pH, koncentrácia rozpusteného kyslíka, geometria miešadla a frekvencia miešania [30].

2.5.1 Biosyntetická dráha kyseliny hyalurónovej

Biosyntéza kyseliny hyalurónovej mikroorganizmami rodu *Streptococcus* prebieha dvomi súbežnými dráhami, pričom každá z nich vedie k tvorbe jedného z cukrových prekursorov, kyseliny β -D-glukurónovej a N-acetyl- β -D-glukóзамínu. Has operón kóduje v mikroorganizme *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* okrem hyaluronan syntázy aj ďalšie enzýmy podieľajúce sa na biosyntéze aktivovaných cukrov [42]: UDP-glukóza dehydrogenáza (hasB), UDP-glukóza pyrofosforyláza (hasC), glmU paralóg majúci dvojité funkciu enzýmu acetyltransferázy a pyrofosforylázy (hasD) a pgi paralóg pre fosfoglukoizomerázu (hasE) [41].



Obr. 2.4: Biosyntetická dráha kyseliny hyalurónovej [4, 43].

Prvým krokom biosyntézy zobrazenej na obrázku 2.4 je fosforylácia glukózy za účasti enzýmu hexokinázy, čím vzniká glukóza-6-fosfát. Ten je zapájaný do dvoch syntetických dráh, pričom každá z nich vedie ku vzniku jedného kľúčového prekursoru – kyseliny UDP-glukurónovej a UDP-*N*-acetylglukóзамínu.

V prvom súbore reakcií, vedúcom ku vzniku kyseliny glukurónovej, enzým α -fosfoglukomutáza (Pgm) konvertuje glukózu-6-fosfát na glukózu-1-fosfát. Následne je fosfátová skupina z uridíntrifosfátu prenesená UDP-glukózapyrofosforylázou (hasC) na glukózu-1-fosfát za vzniku UDP-glukózy. UDP-glukóza je oxidovaná UDP-glukózadehydrogenázou (hasB), čím vzniká prvý prekursor kyseliny hyalurónovej, UDP-glukurónová kyselina.

V druhej časti metabolickej dráhy je glukóza-6-fosfát konvertovaná fosfoglukoizomerázou (hasE) na fruktózu-6-fosfát. Na tú je pomocou amidotransferázy (GlmS) pripojená amínoskupina z glutamínu. Tým vzniká glukóзамín-6-fosfát, ktorý je mutázou (GlmM) premenený na glukóзамín-1-fosfát. Ten je následne acetylovaný acetyltransferázou (hasD) a aktivovaný fosforyláciou enzýmom pyrofosforyláza (hasD), čo vedie k vzniku druhého cukrového prekursoru, UDP-*N*-acetylglukóзамínu.

Hneď po syntéze oboch prekursorov ich hyalurónan syntázy (hasA) polymerizujú za vzniku polyméru kyseliny hyalurónovej. K tomuto kroku dochádza na cytoplazmatickej membráne a v koordinácii so syntézou sú molekuly vytláčané do extracelulárnej matrix.

Biosyntéza kyseliny hyalurónovej je pre baktérie energeticky náročným procesom. Niektoré medziprodukty tvorby HA sú zapojené do biosyntézy bunkovej steny, rastu buniek a tvorby laktátu v glykolýze. Kvôli spotrebe rovnakého prekursoru si procesy syntézy HA a rastu buniek biochemicky konkurujú. Ďalšou limitáciou v tvorbe HA je konkurencia o prísun uhlíka medzi syntézou HA a glykolýzou. Preto je možné oslabením glykolytického procesu a znížením miery tvorby biomasy dosiahnuť zvýšenie tvorby HA a jej molekulovej hmotnosti [43].

2.5.2 Mikroorganizmus a jeho nutričné požiadavky

Streptokoky sú auxotrofné mikroorganizmy, majú teda špecifické nutričné požiadavky na niektoré aminokyseliny a vitamíny. V zložení média sú zvyčajne zahrnuté kvasinkové alebo živočíšne extrakty, či hydrolyzáty kazeínu. Esenciálnymi pre syntézu polysacharidov sú tiež kationy mangánatých a horečnatých iónov. Občas je ako rastový faktor do média pridávaná teľacia krv alebo krvná plazma, prípadne lyzozým na stimuláciu produkcie HA. Zvyšujúce sa obmedzenia regulačných agentúr v Európe ale aj v USA a špecifické obavy, prísne sa týkajúce každej zlúčeniny pochádzajúcej zo živočíšnych zdrojov, v súčasnosti bránia využívaniu týchto zložiek vo výrobných procesoch [30]. Na produkciu HA je potrebné optimálne množstvo uhlíkatých a dusíkatých zdrojov organického, ale aj anorganického charakteru [44]. Pre štúdie mikrobiálneho metabolizmu bolo formulovaných niekoľko chemicky definovaných médií, ale z dôvodu nízkeho výťažku sa ukázalo, že nie sú vhodné na priemyselné využitie [30].

2.5.3 Základné parametre fermentácie

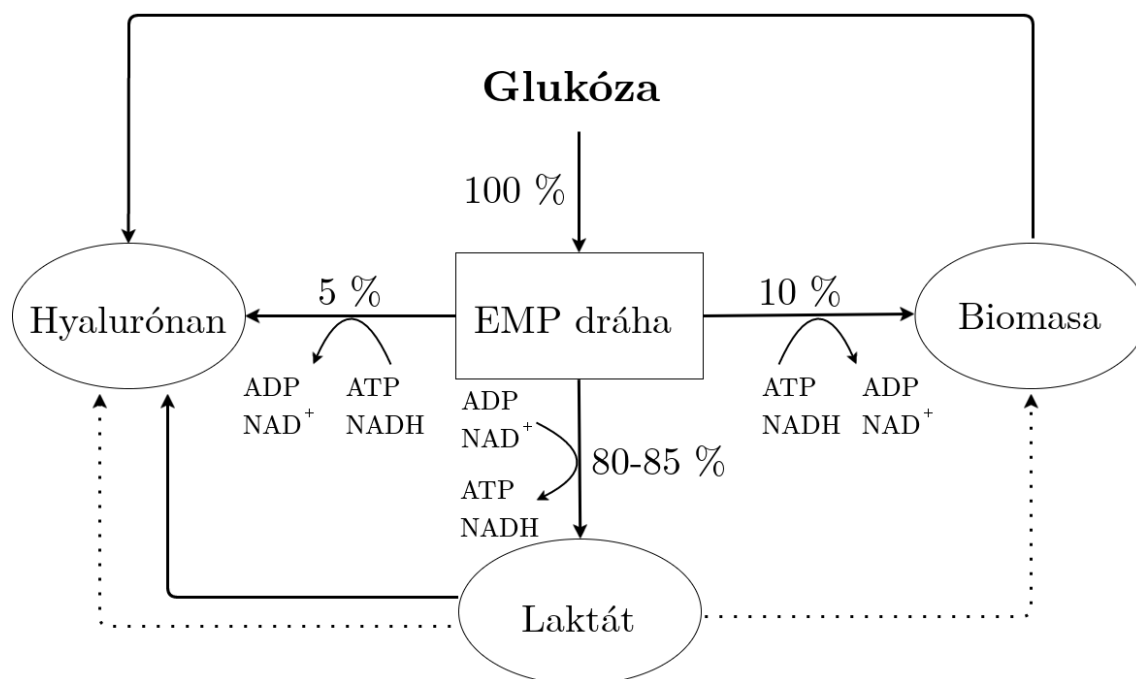
Na produkciu HA sa používajú rôzne typy fermentácie. Patrí medzi ne vsádková, prítoková aj kontinuálna. Najčastejšie je používaná vsádková, no v dôsledku ťažkého spracovania viskózneho média je produkcia HA obmedzená do maximálnej koncentrácie 6-7 g/l. Využívanie kontinuálnej fermentácie je výťažnejšou stratégiou, pretože bunkový rast streptokoka môže byť udržiavaný v exponenciálnej fáze, ktorej predĺženie vedie k zvýšenej produkcii HA. To je dôsledkom faktu, že činnosť hyalurónan syntázy sa pozastavuje až v stacionárnej fáze [45].

Najvyšší bakteriálny rast bol pozorovaný za optimálnych kultivačných podmienok pri pH=7 a teplote 37 °C pri neobmedzenom množstve glukózy. Najvyššia produktivita a najväčšia molekulová hmotnosť HA bola zaznamenaná pri suboptimálnych rastových podmienkach, keď bunky rástli pomalšie a energia bola dostupná pre ostatné procesy [46].

Enzymatická aktivita a rýchlosť konverzie hyalurónan syntáz závisí na hladine aktivovaného cukrového prekursoru. Na produkciu HA je vo vsádkových fermentačných procesoch najčastejšie aplikovaná koncentrácia cukru v romedzí 60-70 g/l.

Za cieľom zvýšenia výťažku bolo úspešné zavedenie pulzných prídavkov cukru, väčšinou sú používané dve dávky (od 20 do 50 g/l) po 8 až 10 hodinách fermentácie [30]. Pri obmedzenom množstve glukózy najprv dochádza k zníženiu produkcie HA a následne k poklesu molekulových hmotností [47].

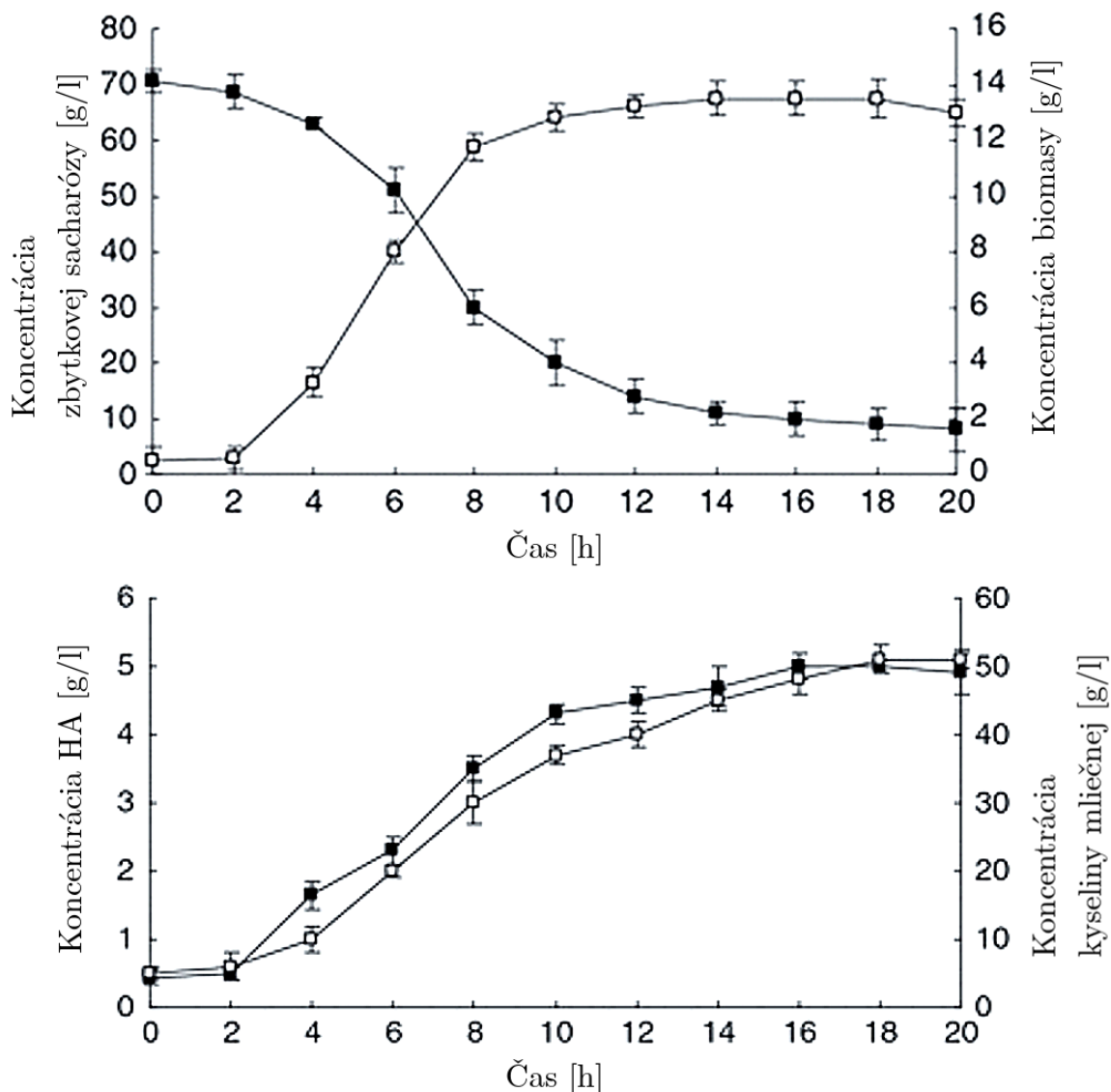
Za suboptimálnych rastových podmienok je možné znížiť množstvo uhlíkatého zdroja, čím dôjde ku kompetícii medzi bunkovým rastom a syntézou HA [46]. Veľmi efektívna je kombinácia vsádkovej a prítokovej kultivácie, čo dokázal Liu a kol. [48]. Fermentáciu rozdelil na dve fázy, v prvej (0-8 hodín) bol *S. zooepidemicus* fermentovaný prítokovou kultiváciou a v druhej (po 8-20 hodinách) prešiel na vsádkovú fermentáciu s počiatočnou koncentráciou sacharózy 15 g/l. V tejto dvojfázovej stratégii bola produkcia kyseliny hyalurónovej zvýšená o 32 % [48].



Obr. 2.5: Vzťah medzi bunkovým rastom, syntézou kyseliny hyalurónovej a akumuláciou laktátu. [49].

Na obrázku 2.5 je vykreslený tok glukózy ako uhlíkatého zdroja. Počas fermentácie je na rast buniek utilizovaných približne 5 % uhlíkatého zdroja, na syntézu HA približne 10 % a 80-85 % je použitých na výrobu kyseliny mliečnej a octovej [49]. Zdroj uhlíka a energie je predmetom konkurencie bunkového rastu a syntézy HA, zatiaľ čo vznikajúca kyselina mliečna inhibuje ako bunkový rast, tak aj syntézu HA [50].

Pre lepšiu predstavu priebehu fermentácie bol priložený vzťah medzi produkciami jednotlivých metabolitov a bunkového rastu znázornený na obrázku 2.6. Mikroorganizmus bol pri tomto pokuse síce alkalicky stresovaný, pre vykreslenie vzťahu medzi tvorbou biomasy a jednotlivými metabolitmi je však model postačujúci. Na obrázku 2.6 môžeme vidieť, že po dvojhodinovej lag-fáze sa bunky začali množiť exponenciálnou rýchlosťou, ktorá trvala až do času 10 hodín a koncentrácia biomasy dosiahla najvyššiu hodnotu po štrnástich hodinách. Sacharóza spotrebovaná na rast HA poklesla z pôvodných 70 g približne na 8 g. Produkcia HA a kyseliny mliečnej bola takmer synchronná. Koncentrácia



Obr. 2.6: Časový priebeh parametrov fermentácie.

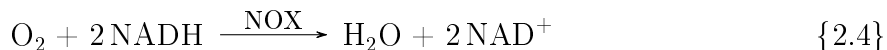
Zhora: rastu buniek - koncentrácie biomasy (biely štvorec), koncentrácie zbytkovej sacharózy (čierny štvorec); koncentrácie HA (biely štvorec) a kyseliny mliečnej (čierny štvorec) [49].

HA dosiahla maximálnu koncentráciu 5 g/l po 16-tich hodinách fermentácie a celkové množstvo akumulovanej kyseliny mliečnej za celú fermentáciu bolo 52 g/l [49].

2.5.4 Aerácia

Ďalším kľúčovým parametrom počas procesu výroby hyaluronátu je aerácia. Biopolymér môže byť vyrábaný aeróbne, ale aj anaeróbne. Aeróbna fermentácia vykazuje vyššiu molekulovú hmotnosť hyaluronanu a o 20% vyššie výťažky. Podporu produkcie HA prídavkom kyslíka možno vysvetliť nasledujúcim spôsobom. V prítomnosti kyslíka a katalyzátora NOX vzrastá energetický výťažok (uvedené v reakcii 2.4). Kyslík rozpustený v médiu môže presmerovať časť toku uhlíka na tvorbu acetátu namiesto laktátu, čím sa vytvoria namiesto dvoch molekúl ATP až tri. Vďaka tejto získanej energii sa dosahujú vyššie vý-

ťažky bunkovej hmoty a HA [30]. Expresia hyalurónan syntázy je za aeróbných podmienok až deväťkrát vyššia ako za anaeróbných. Kyslík indukuje enzýmy zapojené do produkcie UDP-*N*-acetylglukózamínu (hasD) a Krebsovho cyklu, ktorý poskytuje ďalšiu molekulu ATP a acetylkoenzýmu A, ktorý môže byť znova použitý na syntézu HA [51].



2.5.5 Využitie suboptimálnych podmienok na zvýšenie produkcie HA

Ako bolo uvedené už skôr, baktérie využívajú na syntézu kyseliny hyalurónovej rovnaké prekursorzy ako na rast bunky, glukóza-6-fosfát sa navyše uplatňuje v procese glykolýzy, čím dochádza medzi týmito pochodmi ku kompetícii. Rýchly rast biomasy nemá priaznivý vplyv na tvorbu kyseliny hyalurónovej [46], preto utlmením glykolytických procesov a znížením rýchlosti rastu buniek dochádza k navýšeniu výťažku kyseliny hyalurónovej aj molekulovej hmotnosti. Experiment, ktorý previedol Liu a kol. spočíval v zmene pH z optimálnej hodnoty 7,0 na vyššiu (8,0; 8,5; 9,0) v trvaní 0,5; 1,0; 1,5 h. Stresovanie prebiehalo od šiestej hodiny fermentácie, ktorá predstavuje strednú fázu exponenciálneho rastu, až do konca fermentácie (16 h) [49]. To viedlo ku presmerovaniu uhlíkatého zdroja od tvorby biomasy a produkcie laktátu ku syntéze HA a acetátu. Vďaka tomu sa oslabil inhibícia produkcie HA kyselinou mliečnou a tvorbou acetátu sa získala jedna molekula ATP navyše, čo znova podnietilo tvorbu HA. V ďalšom experimente Liu a kol. spomalil množenie baktérií pravidelnou zmenou hodnoty pH optimálnej pre rast buniek (7,0) na suboptimálnu hodnotu (8,0). K zmene dochádzalo po dvoch hodinách medzi 6. a 16. hodinou kultivácie. Týmto postupom bol zvýšený výťažok kyseliny hyalurónovej z 5,0 na 6,5 g/l [48]. Jagannath a kol. spomaľoval rast buniek pravidelnou zmenou teploty z 37 °C na 30 °C, glykolýzu oslabil prídavkom pyruvátu. Aj táto metóda viedla k navýšeniu výťažku kyseliny hyalurónovej [52].

2.5.6 Miešanie

Miešanie média je dôležitým faktorom ovplyvňujúcim výťažky aj molekulovú hmotnosť HA [46] napriek tomu, že sa polymérny reťazec HA uvádza ako náchylný na mechanický stres [30]. Zvýšením miešania vzrastá výťažnosť HA za aeróbných aj anaeróbných podmienok. Dôvodom môže byť zvýšený pohyb, teda zníženie viskozity kultivačného média a lepší prístup baktérie ku kyslíku a uhlíkatému zdroju [46]. Pri miernych otáčkach miešadiel sa zvyšuje molekulová hmotnosť HA, pokles naopak nastáva pri zvýšenej rýchlosti otáčania, pretože za týchto podmienok vznikajú strižné sily [53].

2.5.7 Purifikácia a získanie HA z produkčného média

Po odstránení buniek z fermentačného média je HA dôsledne purifikovaná. Izolácia buniek z produkčného média je pomerne zložitá. Pri vysokých výťažkoch HA viskozita produkčného média vzrastá a to vytvára vztlakovú silu, kvôli ktorej je odstredenie buniek bez zriedenia média takmer nemožné [30].

Procesy purifikácie a zrážania HA z produkčného média sú finančne nákladné a náročné na odstránenie všetkých znečisťujúcich látok. Bolo patentovaných mnoho spôsobov purifikácie HA.

Zrážanie HA z média môže byť vykonaná použitím neiónového surfaktantu, zrazenina rozpustená v roztoku chloridu vápenatého a bunky môžu byť odstránené centrifugáciou alebo filtráciou po pridaní acetátového pufru. Na získanie čistej HA sa používajú zrážadlá ako etanol a izopropylalkohol, ktorými sa HA niekoľkonásobne purifikuje, pred ukončením zrážania sa môže zrazenina HA rozpustiť vo vode a zvyškové znečisťujúce látky sa môžu odstrániť pridaním aktívneho uhlia a následnou filtráciou. Na získanie HA farmaceutickej kvality sa HA purifikuje striedavo sa opakujúcimi prídavkami cetyl pyridínium chloridu, rozpustením zrazeniny a zrážaním izopropanolom. Nakoniec sa roztok získanej HA ešte môže dočistiť prechodom kolónou s kremičitanom horečnatým a mikrofiltráciou, ďalším zrážaním izopropanolom a finálnym čistením etanolom. Na odstránenie nečistôt sa pri vyššie zmienených metódach často používajú kvartérne amóniové soli, ktoré ale vytvárajú veľké množstvá odpadovej vody a s najväčšou pravdepodobnosťou budú prítomné aj v konečnom produkte. Preto bol namiesto použitia týchto solí vyvinutý spôsob purifikácie aniónaktívnymi iónomeničmi, ich použitie je však finančne nákladné. Nečistoty je možné odstrániť aj použitím hlinitanu zinočnatého ako adsorbenta, ktorý sa z roztoku odfiltruje, alebo filtráciou cez elektricky nabitý filter.

Metódy purifikácie sú síce náročné nielen energeticky, ale aj časovo, ale správnymi kombináciami zmienených metód je v dnešnej dobe možné získať vysokočistú HA v relatívne krátkom čase [54].

2.6 Enzýmy hyaluronidázy

Molekulárna genetická analýza ukázala, že podľa homológie sekvencie aminokyselín môžu byť hyaluronidázy zoskupené do dvoch hlavných skupín: hyaluronidázy z eukaryotov a prokaryotov. Prvá klasifikácia hyaluronidáz bola stanovená podľa ich mechanizmu katalýzy už v sedemdesiatych rokoch. Táto klasifikácia bola založená na substrátovej špecifite a biochemickej analýze hyaluronidáz a ich reakčných produktov a pozostáva z troch skupín.

Prvou skupinou sú hyaluronidázy mikrobiálneho pôvodu, bakteriálne hyaluronát lyázy. Degradujú HA pomocou β -eliminácie, čo vedie ku vzniku disacharidov. Tieto lyázy boli izolované z niekoľkých druhov mikroorganizmov ako *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* a *Streptomyces*, ktoré sa líšia v substrátovej špecifite.

Druhou skupinou sú hyaluronidázy vyskytujúce sa v slinných žľazách pijavíc a hlíst. Tieto enzýmy sú hyaluronát-3-glykánohydrolázy a štiepia 1,3-glykozidickú väzbu, čím vznikajú tetra a hexasacharidy s kyselinou glukurónovou na redukujúcom konci.

Do tretej skupiny patria cicavčie hyaluronidázy 4-glykánohydrolázy, ktoré náhodne štiepia 1,4-glykozidickú väzbu a ich hlavným produktom sú tetrasacharidy. Tieto glykozidázy majú hydrolytickú a transglykozidázovú aktivitu a okrem HA degradujú aj iné molekuly. Najznámejšie hyaluronidázy tejto triedy sú testikulárna, lyzozomálna a hyaluronidáza z včelieho jedu [55].

V tejto práci bol použitý enzým BTH (z anglického Bovine Testine Hyaluronidase). Štruktúrne sa jedná o tetramér pozostávajúci zo štyroch rovnakých podjednotiek [56]. Aktívne hyaluronidázy v semenníkoch cicavcov boli objavené už dávno, rovnako ako aj príprava hovädzích a ovčích hyaluronidáz na terapeutickú aplikáciu [55]. BTH náhodne hydrolyzuje 1,4-väzby medzi N-acetyl- β -D-glukóзамínom a D-glukuronátovými zvyškami v hyaluronáte. Ďalej hydrolyzuje 1,4- β -D-glykozidické väzby medzi N-acetyl-galaktóзамínom alebo N-acetyl-galaktóзамín sulfátom a kyselinou glukurónovou v chondroitíne, chondroitín-4- a -6-sulfáte [57] a v malom rozsahu pôsobí aj na dermatansulfát [55]. Optimálne pH enzýmu je 4,5 až 6,0 [58] a jeho špecifická aktivita je 400-1000 U/mg pevnej látky [59]. (Špecifická aktivita je také množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje tvorbu 1 μ mol produktu za 1 minútu pri štandardných – optimálnych podmienkach [60]). Ako hlavné a najmenšie produkty ich hydrolýzy boli identifikované tetrasacharidy a disacharidové fragmenty [55].

2.6.1 Zníženie viskozity fermentačného média

V hydrodynamike je viskozita mierou trecieho odporu, ktorý kladie pohybujúca sa kvapalina pôsobiacej strižnej sile. Parametre, ktoré ovplyvňujú tok roztoku polyméru sú napr. koncentrácia polyméru, rozpúšťadlo, teplota, tlak a iné; preto nie je ľahké tieto viskozimetrické merania interpretovať. Z tohto dôvodu sú presné merania vykonávané v zriedených roztokoch, v ktorých sú interakcie medzi molekulami polymérov minimalizované, vtedy sa uplatňujú len interakcie medzi polymérom a rozpúšťadlom.

2.6.2 Prídavok hyaluronidáz počas fermentácie

Liu a kol. sa v štúdií fermentácie mikroorganizma *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* zaoberal prídavkom rôznych koncentrácií hyaluronidázy E.C.3.2.1.36 (patrí medzi 3-glykánohydrolázy a náhodne štiepi 1,3 väzby v HA) do média v 8. h fermentácie.

Číslo experimentu	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Koncentrácia hyaluronidázy [g/l]	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Koncentrácia biomasy [g/l]	13,6	14,2	15,3	16,7	18,9	19,0
Koncentrácia zbytkovej sacharózy [g/l]	8,6	7,3	6,2	5,3	4,7	3,1
Koncentrácia HA [g/l]	5,0	5,3	5,6	6,0	6,0	6,0
M_w HA [kDa]	1 300	500	200	45	32	21
Index polydisperzity (PDI)	1,8	1,7	1,5	1,4	1,3	1,2

Tab. 2.1: Vplyv prídavku hyaluronidázy na fermentáciu *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [11]

Počiatočná koncentrácia sacharózy bola 70 g. V tejto štúdií (Tab. 2.1) bolo zistené, že zvýšenie prestupu kyslíka inhibuje syntézu kyseliny mliečnej. Molekulová hmotnosť HA a index polydisperzity (PDI) klesal s rastúcou koncentráciou enzýmu.

Bol potvrdený predpoklad zvýšenia výťažku vďaka zmierneniu limitácie produkcie HA prestupom kyslíka. Koncentrácia HA sa zvyšovala s rastúcou koncentráciou enzýmu až do 0,15 g/l. Koncentrácia enzýmu vyššia ako 0,15 g/l nemala ďalší vplyv na výťažok HA. Táto skutočnosť je daná kritickou hodnotou koncentrácie rozpusteného kyslíka pre produkciu HA, ktorá činí 5 % [11].

V štúdiu, ktorej sa venoval Jin a kol., bol v 60-100 hodinovej prítokovanej fermentácii geneticky modifikovaného mikroorganizmu *Bacillus subtilis* ovplyvňovaný výťažok a molekulová hmotnosť HA nadmernou expresiou génu pre hyaluronidázu z pijavíc, (LHyal) 3-glykánohydrolázu. Aktivita hyaluronidázy sa zvyšovala exponenciálne počas fermentácie. Médium s koncentráciou sacharózy 15 g/l bolo prítokované sacharózou exponenciálne od 7,5 do 10 g·h⁻¹·l⁻¹. Výťažok HA sa zvýšil z 5,96 g/l na 19,38 g/l, čo je dosiaľ najvyšší publikovaný výťažok HA mikrobiálneho pôvodu. Regulovaná expresia génu pre LHyal bola efektívna pre výrobu špecifickej HA v rozmedzí molekulových hmotností od 2,2 do 169 kDa.

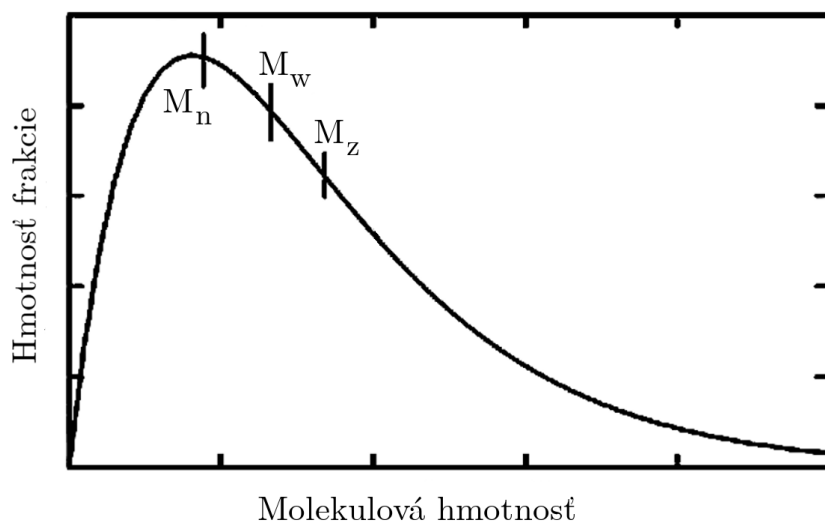
Napriek vysokej výťažnosti použitého kmeňa, ktorý dosahoval produkciu HA o koncentrácii 5,96 g/l (Tab. 2.2) bola produkcia HA limitovaná koncentráciou rozpusteného kyslíka. Prídavkom hyaluronidáz sa jeho konečná hodnota zvýšila z 0 % až na približne 50 % pri R1 a 60 % v prípade experimentov R1 a WT. Z rapidného nárastu výťažku (Tab. 2.2) môžeme usúdiť, že mikroorganizmus *Bacillus subtilis* reaguje zvýšením produkcie HA na rádovo vyššie hodnoty rozpusteného kyslíka, na rozdiel od *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, ktorý je limitovaný už hodnotou 5 % [61].

Označenie experimentu	A	R2	R1	WT
Aktivita hyaluronidázy [U/ml]	0	6,4·10 ⁴	88·10 ⁴	162·10 ⁴
Koncentrácia HA [g/l]	5,96	7,13	9,18	19,38
M_w HA [kDa]	1 420	49,6	18,0	6,62
Index polydisperzity (PDI)	1,34	1,47	1,73	1,96

Tab. 2.2: Vplyv prídavku hyaluronidázy na fermentáciu *Bacillus subtilis* [61]

2.7 Analýza molekulovej hmotnosti a polydisperzity pomocou SEC-MALLS

Mólová hmotnosť je dôležitou charakteristikou každého polyméru [62]. Vo väčšine prípadov nemajú všetky molekuly polyméru rovnaký polymerizačný stupeň. Pre exaktný popis vzorky polyméru je preto potrebné stanoviť množstvo každej frakcie s rovnakou mólovou hmotnosťou, teda distribúciu mólovej hmotnosti použitím komerčne dostupného softvéru. Na obrázku 2.7 môžeme vidieť distribúciu molekulovej hmotnosti polymérov v jednotlivých hmotnostných frakciách.



Obr. 2.7: Význam jednotlivých mólových hmotností v distribúčnej krivke [64].

2.7.1 Molekulová hmotnosť

Číselný priemer mólovej hmotnosti M_n je definovaný ako pomer súčtu hmotností všetkých polymérnych molekúl vo vzorke k celkovému počtu všetkých molekúl [63]. Je senzitívny na zmeny v hmotnostiach jednotlivých frakcií. Malé molekuly predstavujú nízku hmotnosť pre veľké množstvo molekúl, pričom veľké molekuly predstavujú vysokú hmotnosť pripadajúcu malému množstvu molekúl. Preto už malé množstvo nízkomolekulárneho materiálu výrazne zmení celkový počet molekúl. Naopak, táto metóda je pomerne necitlivá na rovnaké zmeny pri vysokomolekulárnych materiáloch [65].

Hmotnostný priemer mólovej hmotnosti M_w poskytujú metódy, u ktorých je meraná veličina závislá od hmotnosti častíc, napr. rozptyl svetla [63]. Intenzita rozptylu pri akomkoľvek uhle je funkciou druhej mocniny molekulovej hmotnosti M_w . Vďaka tomu je príspevok hmotnosti veľkej molekuly významnejší ako príspevok malej molekuly [65].

"z"-priemer mólovej hmotnosti M_z je najmenej používaný priemer mólovej hmotnosti [63] a je mimoriadne senzitívny na prítomnosť vysokomolekulárnych reťazcov [66].

Všetky priemery mólových hmotností sú rovnaké len pre monodisperzné systémy. So zväčšujúcou sa šírkou distribúčnej krivky sa rozdiel medzi jednotlivými priemermi mólových hmotností zväčšuje [63]. Stupňom polydisperzity PDI označujeme pomer hmotnostného priemeru molekulovej hmotnosti M_w ku číselnému priemeru molekulovej hmotnosti M_n . Pre monodisperzný systém je tento index rový 1,00 a s rastúcou distribúciou polyméru sa jeho hodnota zväčšuje. Hodnota PDI určuje šírku distribúcie molekulovej hmotnosti polyméru vo vzorke [66].

2.7.2 SEC-MALLS

Gélová permeačná chromatografia patrí medzi najúčinnnejšie a najpoužívannejšie metódy, ktoré je možné použiť na stanovenie mólovej hmotnosti biopolymérov [62]. Patrí medzi metódy kvapalinovej chromatografie, pri ktorej sa častice delia v závislosti od hydrodynamického rozmeru častíc v roztoku.

K separácii molekúl metódou GPC dochádza v kolónach, ktoré sú naplnené poréz-
nymi časticami (stacionárna fáza). Tieto častice môžu byť sklenené, silikagélové ale naj-
častejšie sa používa napučaný polymérny gél (napr. styrén – divinylbenzénový kopolymér
a HEMA). Analyzovaný polymér sa rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle (koncentrácia činí
približne niekoľko desiatín percenta) a malé množstvo roztoku (najčastejšie 100 μ l) sa dáv-
kuje do prúdu mobilnej fázy. Analyzovaný polymér musí byť v mobilnej fáze rozpustný. Ak
vzorka obsahuje zmes molekúl rôznych rozmerov, najmenšie molekuly prenikajú difúziou
do všetkých pórov náplne a pretože rozpúšťadlo voľne prúdi iba v priestore medzi zrnami
gél, budú najväčšie molekuly vymyté z kolóny ako prvé a menšie molekuly, ktoré sa na
svojom postupe zdržia prenikaním do pórov, opustia kolónu neskôr. Na výstupe z ko-
lóny sú molekuly registrované detektorom. Získaný záznam detektoru (chromatogram)
je grafickým záznamom veľkosti signálu detektoru a elučného objemu. Veľkosť signálu
je úmerná koncentrácii molekúl eluujúcich pri danom elučnom objeme. Elučný objem je
určený veľkosťou molekúl a teda má vzťah k ich mólovej hmotnosti [63].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Kultúra

- *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* CO4A (Contipro)

3.1.2 Enzýmy

- Bovinná hyaluronidáza (Sigma Aldrich)

3.1.3 Chemikálie

- Agar (Sigma-Aldrich)
- Antifoam 204 (Sigma Aldrich)
- Demineralizovaná voda
- Dihydrogénfosforečnan drasený (Lach:ner)
- Dodecylsírán sodný, SDS (Merck)
- Etanol, 96 % p.a (Penta)
- Fenoxyetanol (Lach:ner)
- Glutaman sodný (Sigma Aldrich)
- Glycerol (Penta)
- Hydrogénfosforečnan sodný, dodekahydrát (Lach:ner)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid amónny (Lach:ner)
- Chlorid horečnatý (Lach:ner)
- Chlorid manganatý, tetrahydrát (Lach:ner)
- Chlorid sodný (Lach:ner)
- Izopropanol, 100 % (Penta)
- Kvasničný autolyzát (Amresco)
- Kyselina etyléndiamíntetraoctová, EDTA (Sigma-Aldrich)
- Kyselina hyalurónová (Contipro)
- Kyselina octová (Penta)
- Pšeničný E1 peptón (Organotechnie)
- Sacharóza (Moravskoslezské cukrovary)
- Sírán horečnatý, heptahydrát (Lach:ner)
- a ďalšie bežné chemikálie

3.1.4 Prístroje

- Autokláv (Fedegari)
- Autokláv (Systec)
- Centrifúga 5810R (Eppendorf)
- Centrifúga MiniSpin (Eppendorf)
- Fermentory Labfors (INFORS HS)
- Inkubačný termostat Jouan INNOVENS (ThermoFisher Scientific)
- Laboratórne váhy Adventurer Pro (Ohaus)
- Laboratórna hriadeľová miešačka Eurostar digital (IKA)
- Laboratórna hriadeľová miešačka RW 20 digital (IKA)
- Laminárny box
- Magnetická miešačka C-MAG HS 10 (IKA)
- pH meter pH/Cond 340i (WTW)
- Rotačný viskozimeter Viskolead PRO L (Fungilab)
- Sušiace váhy HR73 (Mettler Toledo)
- Sušiareň Ecocell 55 (BTM)
- Termoblok (Major Science)
- Trepáčka s inkubátorom MaxQ 6 000 (ThermoFisher Scientific)
- UltraTurrax T25 Digital (IKA)
- UV/VIS Spektrofotometer UV2601 (Rayleigh)
- Vortex BenchMixer (Benchmark Scientific)
- Vysokotlakový laboratórny filter (Pall)
- a ďalšie bežné laboratórne vybavenie

3.2 Fermentácia *S. z.*: Kultivačné metódy

3.2.1 Inokulá na zaočkovanie fermentorov

Do Erlenmeyerových baniek bolo naliatých 100 ml pripraveného živného média. Banky boli uzatvorené zátkou z buničitej vaty a prekryté alobalom, následne boli sterilizované v autokláve (Fedegari / Systec) po dobu 20 min pri teplote 120 °C. V laminárnom boxe bolo médium zaočkované kolóniou *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Inokulá boli kultivované 7 h pri 37 °C na trepačke (ThermoFisher Scientific) pri 300 otáčkach/min. Po kultivácii bola skontrolovaná optická hustota, ktorej hodnota musela prevyšovať $A_{640} = 0,500$.

Surovina	Množstvo
Pšeničný pepton	10 g
Kvasničný autolyzát	2,5 g
Sacharóza	40 g
Heptahydrát síranu horečnatého	0,4 g
Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného	4 g
Monohydrát glutamanu sodného	2 g
2,22 M roztok chloridu mangánatého	1 ml
Demineralizovaná voda	1 l

Tab. 3.1: Suroviny na prípravu 1 l živného média E1

3.2.2 Príprava fermentorov

Do vyčistenej nádoby bioreaktoru (Labfors, INFORS HS) boli naliaté 2 l pripraveného média s 10 kvapkami odpeny (Antifoam 204) a vložené pH, prípadne aj kyslíkové sondy. Nádoby bioreaktorov boli sterilizované v autokláve po dobu 20 min pri 120 °C a po mier-
nom vychladení boli pripojené k riadiacej jednotke. Hadičky boli nasadené na peristaltické čerpadlá a pripojené do nádob s privádzanými kvapalinami (roztok NaOH, prípadne en-
zýmu). Bola overená funkčnosť čerpadiel a podmienky v bioreaktoroch boli optimalizované na teplotu 37 °C, pH=7,0 a bola nastavená frekvencia miešania na 300 rpm a zapnutý
prívod kyslíka. Ak bol v experimente používaný enzým, bolo nastavené jeho automatické
nadávkovanie v presnom čase fermentácie. Väčšina pokusov bola vykonaná pri troch opa-
kovaniach, pokusy s 1 000 (0 h) a 10 (7 h) jednotkami enzýmu boli opakované dvakrát.

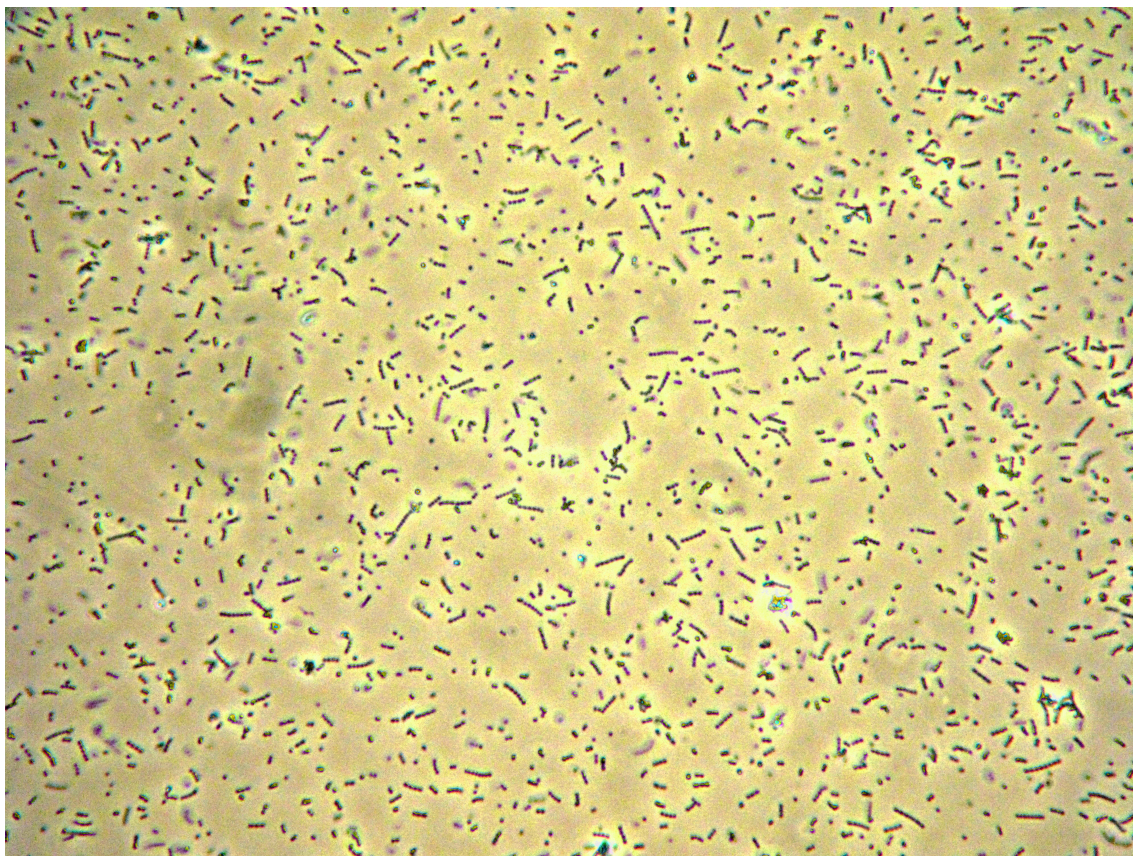
3.2.3 Fermentácia

Po optimalizácii podmienok boli fermentory zaočkované. Kvôli vznikajúcim organickým
kyselinám bolo počas fermentácie automaticky upravované pH roztokom NaOH na hod-
notu 7,0. Enzýmy hyaluronidázy boli pridávané buď na začiatku fermentácie – hneď po
zaočkovaní bioreaktorov, alebo boli automaticky nadávkované v priebehu fermentácie. Po
16-tich hodinách kultivácie boli bioreaktory vypnuté, hadice vodného prietoku a peristal-
tických čerpadiel boli odpojené, boli vybraté pH a kyslíkové sondy a obsah bioreaktorov
bol naliaty do kadičiek.

3.3 Fermentácia *S. z.*: Analytické metódy

3.3.1 Čistota kultúry

Čistota kultúry bola potvrdená mikroskopicky. Na podložné sklíčko bola pipetou nanesená
kvapka produkčného média a pozorovaná pri 50 násobnom zväčšení. Nekontaminovaná
kultúra obsahovala samostatné koky, ktoré sa mohli spájať do retiazok (Obr. 3.1).



Obr. 3.1: Kultúra *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* pri 50 násobnom zväčšení.

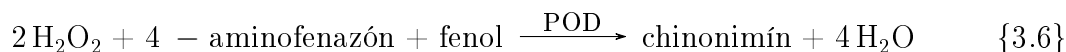
3.3.2 Optická hustota

Do kyvety o objeme 1 000 μl bolo napipetovaných 900 μl demi vody a kyveta bola vložená do spektrofotometra, kde sa nastavila ako blank pri vlnovej dĺžke 640 nm. Potom bolo do rovnakej kyvety napipetovaných 100 μl vzorky z fermentoru. Suspenzia bola premiešaná a kyveta vložená do spektrofotometra. Absorbancia vzorky bola nameraná pri vlnovej dĺžke 640 nm.

3.3.3 Zbytková sacharóza

Do mikroskúmaviek typu eppendorf o objeme 1 500 μl bolo napipetovaných 1 000 μl demi vody a 500 μl vzorky. Takto nariadené vzorky boli centrifúgované 20 min a supernatant bol preliaty do označených mikroskúmaviek. Vzorky boli uschované pri -20°C a po niekoľkých dňoch boli analyzované všetky vzorky naraz. Analýza bola vykonaná enzymaticko – fotometrickým stanovením pomocou kitu glukóza ^LGOD-POD (BioVendor). Meranie nie je ovplyvnené občasným výskytom farebnej zmeny ak je absorbancia činidla $A_{546} < 0,3$.

Princípom metódy je stanovenie glukózy po enzymatickej oxidácii glukózaoxidázou. Peroxid vodíka, 4-aminofenazón a fenol tvoria v reakcii katalyzovanej peroxidázou farebný komplex (Trindlerova reakcia) [67].



Podľa nasledujúceho postupu uvedeného v tabuľke 3.3 boli nariedené štandardné roztoky pre kalibračnú krivku, slepá vzorka (blank) a zriedené roztoky analyzovaných vzoriek. Ku 100 μl vzorky alebo nariedeného roztoku pre kalibračnú krivku boli pridané 2 μl invertázy. Tie boli inkubované po dobu 90 min pri teplote 37 $^{\circ}\text{C}$. Po pridaní roztoku R (Tab. 3.2) boli mikroskúmavky miešané 10 min, potom bola zmeraná ich absorbancia pri vlnovej dĺžke 500 nm. Koncentrácia zbytkovej glukózy bola vypočítaná z predpisu priamky lineárnej regresie kalibračnej krivky.

Látka	Koncentrácia
Fosfátový pufer (ph 7,5)	250 mmol/l
Fenol	5 mmol/l
4-aminofenazón	0,5 mmol/l
Glukózaoxidáza	$\geq 167 \mu\text{kat/l}$
Peroxidáza	$\geq 16,7 \mu\text{kat/l}$

Tab. 3.2: Zloženie komerčného roztoku R

V [μl]	Kalibračná krivka	Analyzované vzorky	Slepá vzorka
Roztok glukózy	0 / 0,5 / 1 / ... / 10	0	0
Demi voda	10 / 9,5 / 9 / ... / 0	0	10
Nariedená vzorka	0	10	0
Invertáza	2	2	2
Roztok R	1 000	1 000	1 000

Tab. 3.3: Objem jednotlivých roztokov pre analýzu zbytkovej sacharózy

3.3.4 Molekulová hmotnosť

Molekulová hmotnosť HA bola analyzovaná metódou SEC-MALLS. Do mikroskúmaviek typu eppendorf o objeme 1 500 μl bolo napipetovaných 1 000 μl deminearizovanej vody a 500 μl vzorky. Nariedené vzorky boli centrifúgované 20 min a supernatant bol preliaty do označených mikroskúmaviek.

Chromatografický systém bol zložený z odplyňovača (Agilent, Model G 1379), pumpy (Agilent, HPLC Model G 1310), ručného injektora (Rheodyne, Model 7125), dvoch kolón 7,8 mm (Ultrasphere Linear (Waters)). Systém zahŕňal chromatografické detektory: detektor DAWN EOS, ViscoStar diferenciálny viskozimeter a Optilab Rex diferenciálny difraktometer (Wyatt Technology, Santa Barbara, Kalifornia). Injekčný objem roztoku

HA pre analýzu bol 100 μ l s koncentráciou 0,015-1 hm. %. Mobilná fáza bola tvorená vodným roztokom fosfátového pufru s koncentráciou 50 mM a 0,02% roztokom azidu sodného. Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 0,5 ml/min. Hodnota prírastku indexu lomu (dn/dc) použitá pre výpočet molekulovej hmotnosti a polydisperzity (M_w/M_n) HA bola 0,155 ml/g. Pre každú vzorku produkčného média boli vykonané tri merania, z ktorých bol vypočítaný priemer.

3.3.5 Dynamická viskozita

Do vysokej kadičky bolo naliatých 200 ml vzorky a teplota bola upravená na 28 °C. Valec rotačného viskozimetra (Viskolead PRO L, Fungilab) bol ponorený do kvapaliny po rysku a meranie bolo vykonané jedenkrát pre každú vzorku.

3.3.6 Gravimetrické stanovenie výťažku

Vzorka média o hmotnosti presne 250 g bola doplnená na objem 1 l demineralizovanou vodou. Na inaktiváciu mikroorganizmov a uvoľnenie HA z buniek bolo pridaných 10 ml roztoku Chelatonu III a SDS (na objem 1 000 ml tohto roztoku pripadali 3 g kyseliny ethyléndiamíntetraoctovej a 8 g dodecylsírany sodného). Po 30 min pôsobenia boli zo suspenzie odstránené bunky prefiltrovaním cez vopred navlhčený celulóзовý filter (pri prídavku vyšších koncentrácií enzýmov sa nechal roztok pôsobiť kvôli ich stálej aktivite iba po dobu 15 minút). Filtrát bol zachytávaný do kadičky o objeme 3 l s 15 g NaCl potrebnými na vyvrážanie a jednoduchšiu sedimentáciu HA. Filtrát bol premiešavaný hriadeľovou miešačkou (IKA) a pre dosiahnutie čo najrýchlejšej sedimentácie bol upravený na pH=5 kyselinou octovou. Potom bol roztok miešaný rýchlosťou 500-600 RPM a 80% izopropylalkohol bol pomaly prilievajú až na konečný objem 3 l, čím bola vyvrážaná HA. Suspenzia bola miešaná približne 10 minút pri rovnakých otáčkach. Sedimentácia trvala 30-60 min a izopropylalkohol nad usadenou kyselinou hyalurónovou bol dakantovaný do zbernej nádoby. Produkt bol preliaty do menšej kadičky o objeme 800 ml a bol doplnený na objem 300 ml 80 % izopropylalkoholom. Zrazenina HA bola rozbitá na menšie vločky prístrojom UltraTurrax (T25 Digital, IKA) a izopropylalkohol bol znova dekantovaný. Purifikácia 80% izopropylalkoholom bola zopakovaná ešte raz a potom bol tento postup zopakovaný ešte dvakrát so 100% izopropylalkoholom o objeme 300 ml. Nakoniec bol výťažok premiestnený na označenú Petriho misku a vložený do sušiarne, kde sa sušil 12-24 hodín. Vysušené vločky HA boli odvážené na predvážkach (Adventurer Pro, Ohaus) s presnosťou 0,01 g. Získaný výťažok obsahoval ešte isté množstvo vody, preto bola na sušiacich váhach (HR73, Mettler Toledo) zistená vlhkosť produktu.

3.3.7 Vplyv koncentrácie enzýmov na viskozitu média

Pre zistenie aktivity enzýmov v použitom živnom médiu bol modelovaný experiment štiepenia vysokomolekulárnej HA, ktorá bola produktom bežnej biotechnologickej výroby. Koncentrácia HA v médiu bola zvolená 4 g/l, pretože výťažky HA použitým spôsobom fermentácie sa pohybujú okolo tejto hodnoty. V piatich Erlemneyerových bankách o objeme 1 000 ml bolo rozpustených 1,2 g HA v 300 ml živného média E1 (Tab. 3.1). Aby sa zabránilo kontaminácii roztoku počas manipulácie, do každej banky boli pridané 3 ml konzervantu fenoxietanolu. Tieto banky boli uzatvorené zátkami z buničitej vaty a ponechané na magnetickej miešačke (C-MAG HS 10, IKA) niekoľko hodín až do rozpustenia HA. Potom bolo do každej banky napipetovaných postupne toľko enzýmu, aby odpovedal koncentrácii 10, 25, 50, 100 a 1 000 U (BTH) / g (HA). Hneď po pridaní enzýmu bola zistená dynamická viskozita na rotačnom viskozimetri (Viskolead PRO L, Fungilab) a ďalšie hodnoty viskozity boli merané každú hodinu, celkovo po dobu 5-8 hodín. Každé meranie bolo uskutočnené raz.

3.3.8 Overenie zrážania HA o rôznych molekulových hmotnostiach

Jeden gram kyseliny hyalurónovej o známej molekulovej hmotnosti v rozmedzí od 30 do 1 000 kDa bola rozpustená v 200 ml demineralizovanej vody. K tomuto roztoku bol pridaný 1 g NaCl a pH bolo upravené kyselinou octovou na hodnotu pH=5. Takto pripravený roztok bol na magnetickej miešačke (C-MAG HS 10, IKA) zrážaný 100% izoporopanolom o objeme 400 ml. Po jednej hodine sedimentácie bola pozorovaná účinnosť zrážania a sedimentácie, tvar a veľkosť vzniknutých vložiek, teda celková kvalita zrážania.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

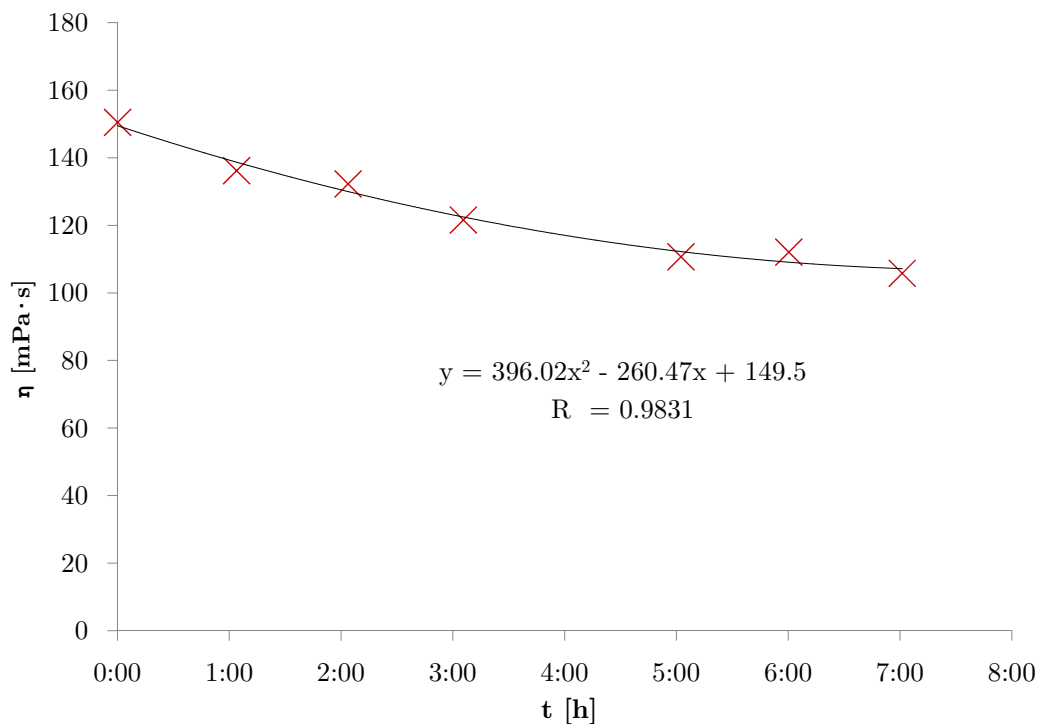
Fermentácia mikroorganizma *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* zameraná na výrobu HA bola uskutočnená v bioreaktoroch o objeme dva litre, trvala šesťnásť hodín a na fermentáciu bolo použité komplexné médium. Celkovo bolo prevedených 6 experimentov s prídavkami enzýmov a 1 referenčný pokus bez prídavku. Každý experiment bol opakovaný 2-3 krát a bola sledovaná dynamická viskozita produkčného média, molekulová hmotnosť, koncentrácia HA a zbytkovej glukózy.

Keďže viskozita roztoku HA je funkciou jej molekulovej hmotnosti, bola meraná závislosť dynamickej viskozity roztoku hyalurónanu v čase po prídavku 10; 25; 50; 100 a 1 000 U (BTH) / g (HA). Pred samotnou fermentáciou bola na základe výsledkov z tohto experimentu optimalizovaná koncentrácia pridávaného enzýmu BTH.

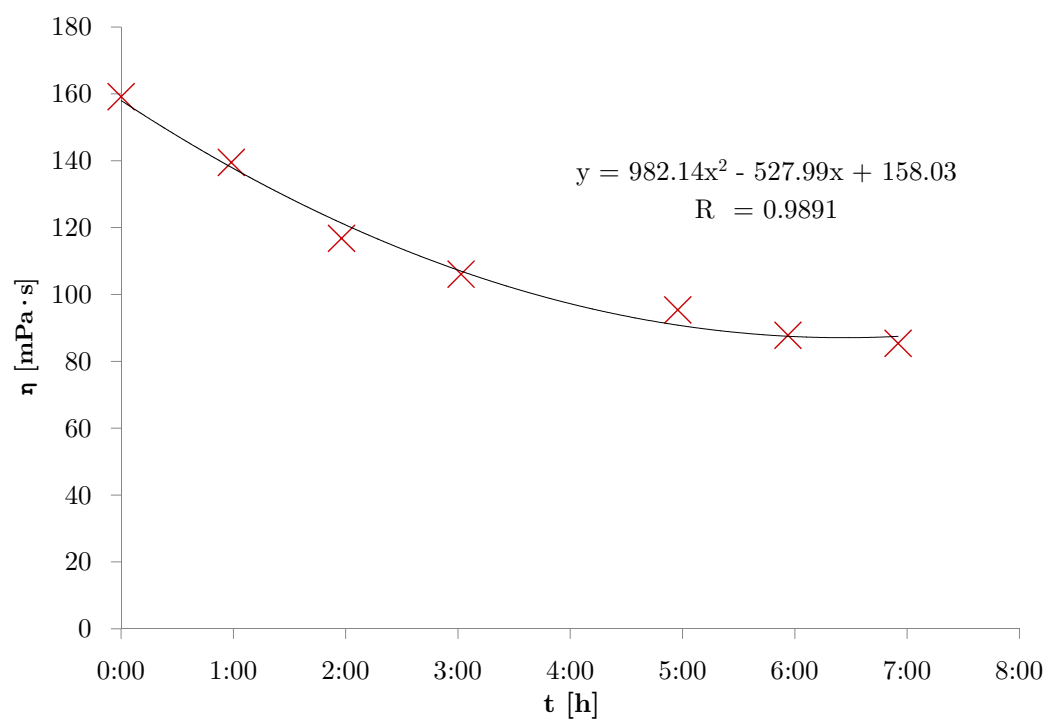
4.1 Rýchlosť štiepenia enzýmu pri fermentačných podmienkach

Výsledky experimentov zameraných na zistenie zmeny viskozity média vplyvom koncentrácie enzýmov (Obr. 4.1 – 4.5) boli modelované na zistenie rýchlosti štiepenia enzýmu pri podmienkach fermentácie.

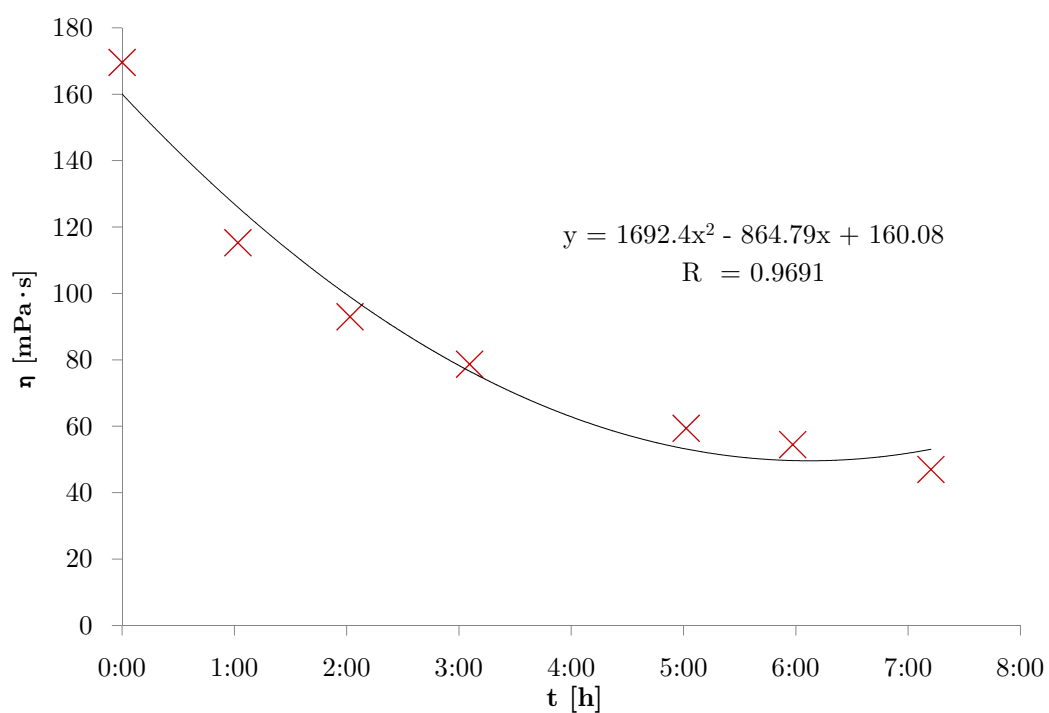
Grafy zmien dynamickej viskozity roztokov hyalurónanu v čase po prídavku 10 – 1000 U (BTH) / g (HA)



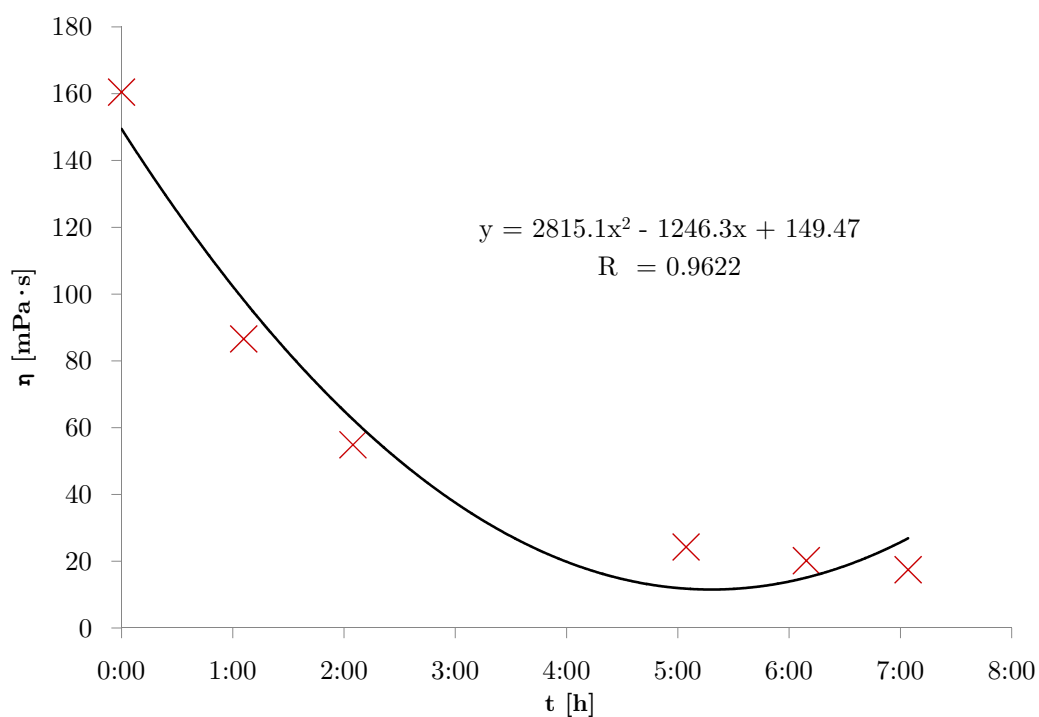
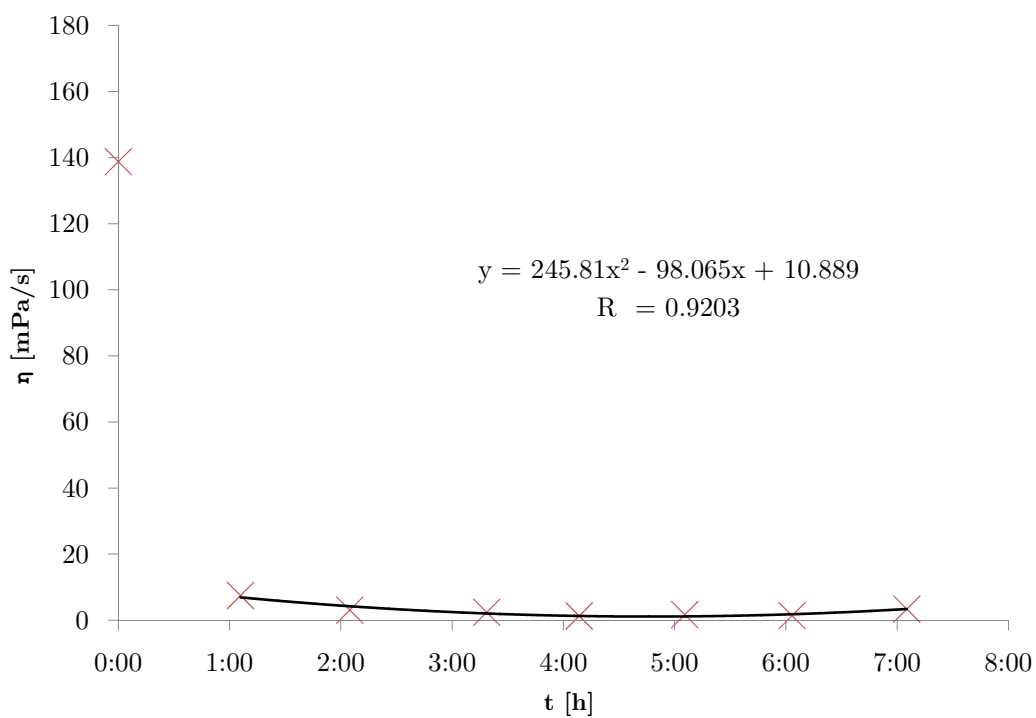
Obr. 4.1: Prídavok 10 U (BTH) / g (HA).



Obr. 4.2: Prídavok 25 U (BTH) / g (HA).



Obr. 4.3: Prídavok 50 U (BTH) / g (HA).

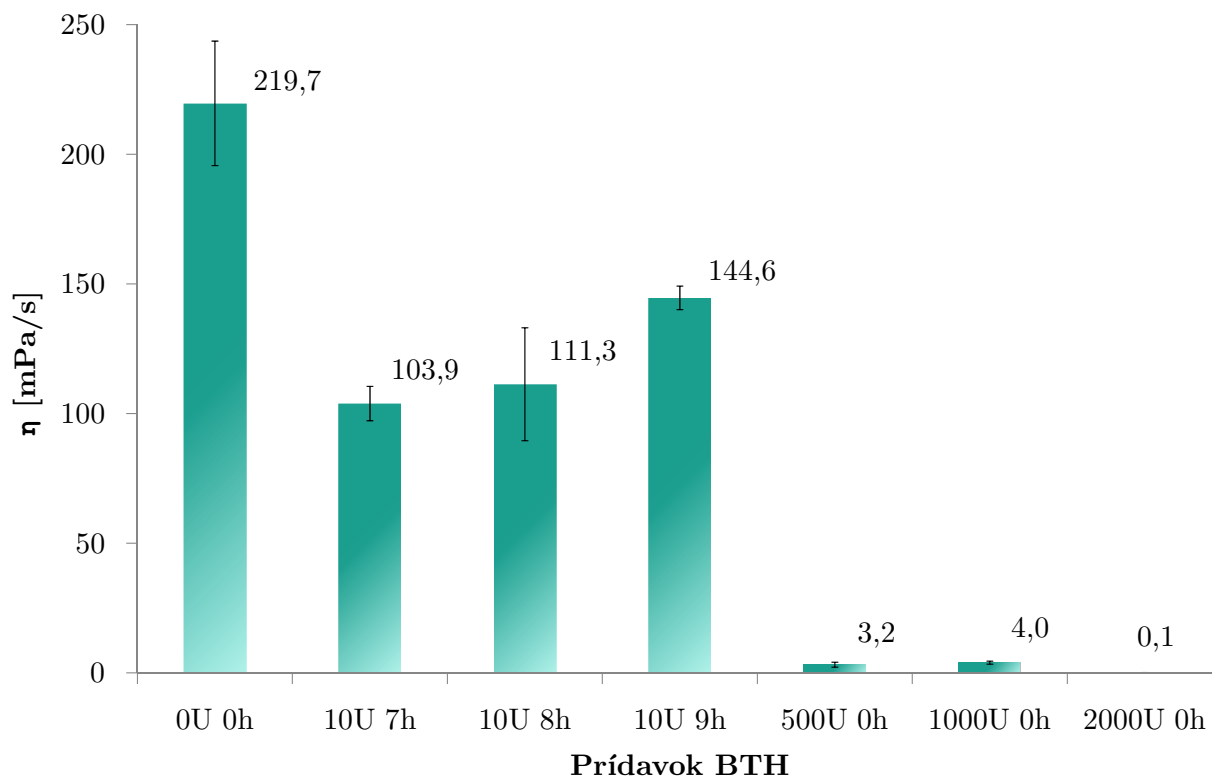
**Obr. 4.4:** Prídavok 100 U (BTH) / g (HA).**Obr. 4.5:** Prídavok 1 000 U (BTH) / g (HA).

Už prídavok 10 U enzýmu mal viditeľný vplyv na dynamickú viskozitu produkčného média a po prídavku 1 000 jednotiek enzýmu boli namerané hodnoty také nízke, že sa nachádzali pod detekčným limitom prístroja. Kvôli viditeľnému poklesu viskozity už pri nízkej koncentrácii enzýmu boli prvé pokusy vykonané s koncentráciou enzýmu 10 U / g (HA).

Použitá metóda má pomerne vysoké odchýlky, napriek tomu bola postačujúca. Dynamická viskozita média, ktorá bola meraná hneď po odpojení fermentorov od riadiacej jednotky, slúžila len ako orientačná veličina na okamžité zistenie aktivity hyaluronidáz. Naopak veľmi presná a citlivá metóda bola použitá na stanovenie molekulovej hmotnosti.

4.2 Zmena produktu po prídavku desiatich jednotiek enzýmu

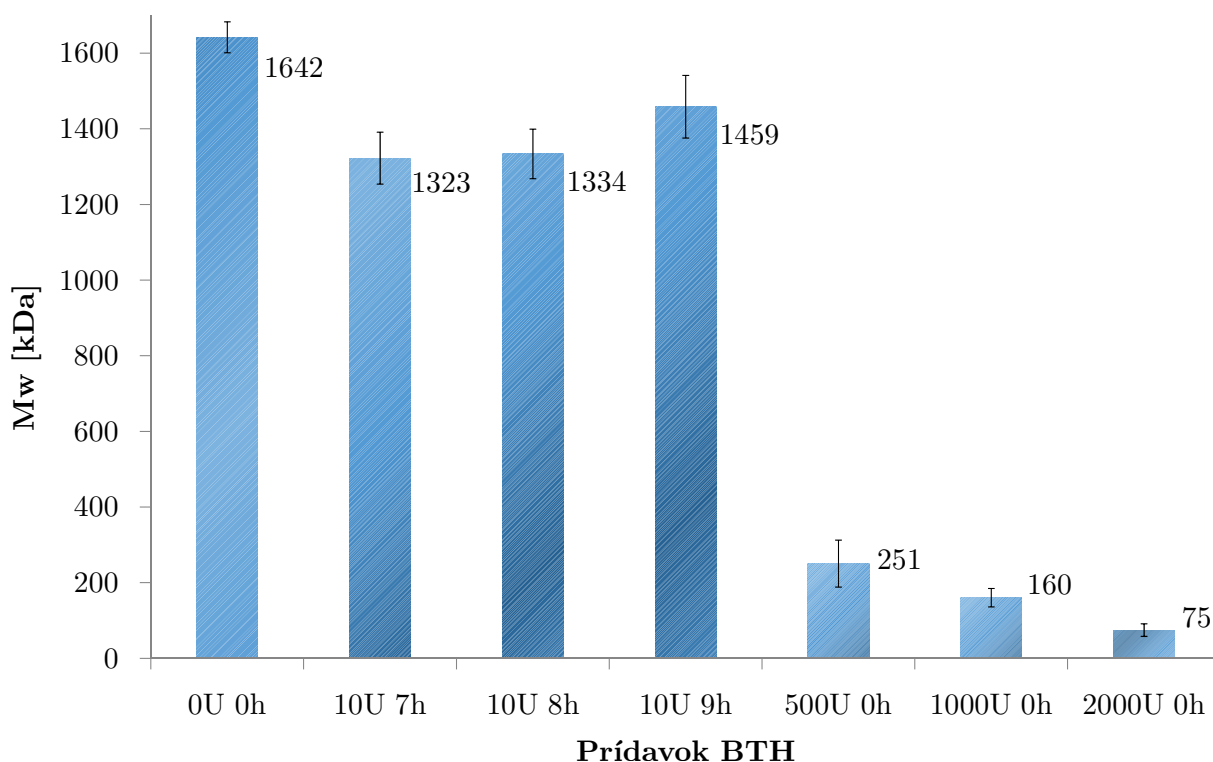
V tejto práci nebola zisťovaná rastová krivka mikroorganizma, preto boli na opísanie nasledujúcich dejov použité literárne dáta. Ako môžeme vidieť v grafe časového priebehu fermentácie v teoretickej časti bakalárskej práce, (Obr. 2.6) medzi 8. – 9. h fermentácie sa rastová krivka nachádza pred koncom exponenciálnej fázy a syntéza HA sa nachádza v poslednej štvrtine svojej najproduktívnejšej fázy. V prvých troch pokusoch bol preto do bioreaktorov pridaný enzým BTH o koncentrácii 10 U / g (HA) v 7., 8., a 9. h fermentácie, to znamená v čase, kedy už bola vyprodukovaná značná časť výťažku HA, teda substrátu pre činnosť hyaluronidázy.



Obr. 4.6: Závislosť viskozity HA v produkčnom médiu na množstve a čase pridaného enzýmu.

Viskozita produkčného média síce poklesla výrazne (Obr. 4.6) – z pôvodných 219,7 mPa·s na 144,6; 111,3; a 103,9 mPa·s, prídavok 10 U (BTH) / g (HA) enzýmu nemal zásadný vplyv na pokles molekulovej hmotnosti HA (Obr. 4.7), vo všetkých troch prípadoch vznikali vysokomolekulárne útvary. Pokles viskozity by v praxi mohol zjednodušiť náročné purifikačné procesy bez zmeny funkcie HA na základe jej molekulovej hmotnosti.

Prídavky enzýmu v rôznom čase kultivácie mali za následok mierne rozdiely v molekulovej hmotnosti a viskozite produkčného média. Čím dlhší čas enzýmy v médiu pôsobili, tým nižšia M_w polyméru vznikala. Pri našich podmienkach kultivácie, ktoré sa mierne odlišovali od optimálnych pre enzým BTH, bola jeho rýchlosť štiepenia nižšia ako v modeloch prevedených na začiatku (Obrázky 4.1 – 4.5).

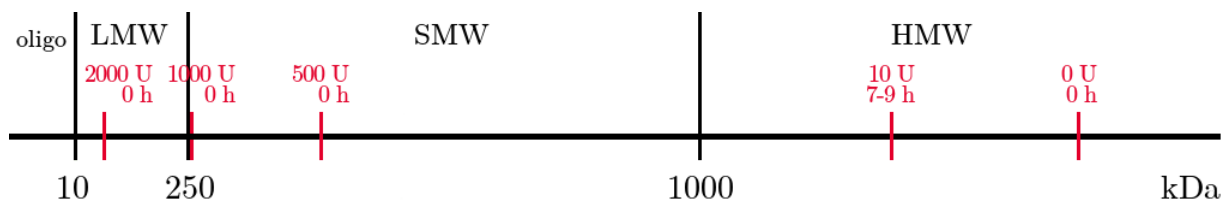


Obr. 4.7: Závislosť molekulovej hmotnosti vzniknutej HA na množstve a čase pridaného enzýmu.

4.3 Vplyv vysokých prídavkov enzýmu na výsledný produkt

4.3.1 Molekulová hmotnosť

Kvôli nevýraznému poklesu MW pri pokuse s 10 U boli pre ďalšie pokusy zvolené rádovo vyššie koncentrácie BTH. Prídavkom 500 a 1 000 jednotiek bola dosiahnutá dĺžka reťazca odpovedajúca MMW a po prídavku 2 000 jednotiek enzýmu došlo k poklesu molekulovej hmotnosti na 74,7 kDa, a teda ku vzniku LMW-HA (Obr. 4.8). V týchto prípadoch bola dynamická viskozita produkčného média veľmi nízka (Obr. 4.6).



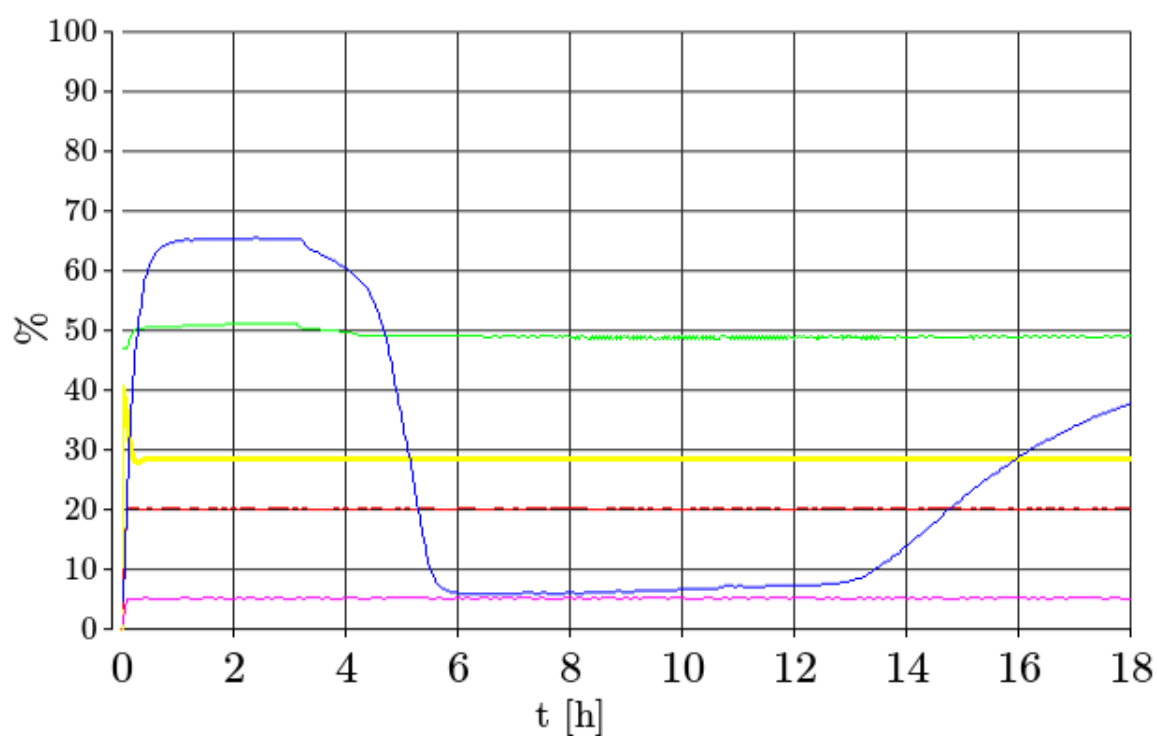
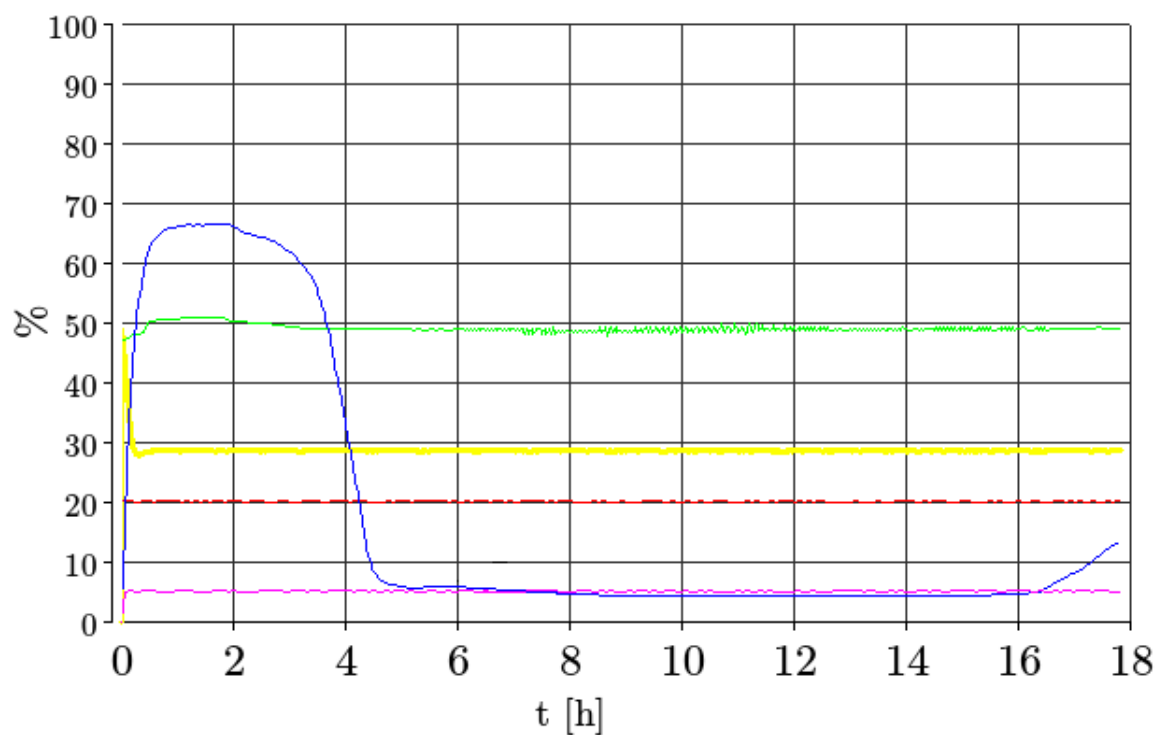
Obr. 4.8: Zaradenie vzniknutých biopolymérov HA do rozmedzí molekulových hmotností.

4.3.2 Prestup kyslíka

Priebeh zmien hodnôt rozpusteného kyslíka v experimente bez prídavku enzýmu a po prídavku 1 000 U enzýmu môžeme vidieť na obrázku 4.9. Fermentácia trvala pri všetkých experimentoch 16 hodín, pre lepšie vykreslenie všetkých fáz rastovej krivky spojenej s koncentráciou rozpusteného kyslíka bola pre tieto grafy vykonaná 18 hodinová fermentácia.

Z referenčného pokusu bez prídavku enzýmu zobrazeného v prvom grafe môžeme vyčítať, že koncentrácia rozpusteného kyslíka v médiu začala klesať v druhej hodine fermentácie po lag-fáze rastu buniek, ktoré ho začali spotrebovávať pre svoj rast. Pred piatou hodinou fermentácie sa rast nachádzal v strednej časti exponenciálnej fáze, kedy značná časť HA bola už syntetizovaná. Príspevok k poklesu koncentrácie rozpusteného kyslíka nebol daný len jeho spotrebou na činnosť buniek, ale aj zvýšením viskozity média a horšieho prestupu kyslíka. Jeho celkový podiel v médiu poklesol na cca 5 %.

Po prídavku 1 000 U enzýmu na začiatku fermentácie môžeme pozorovať veľký rozdiel v koncentrácii rozpusteného kyslíka. Pokles sa oneskoril približne o jednu hodinu a táto hodnota klesla približne na 6 %. Napriek štiepeniu vznikajúcej HA hyaluronidázami bol pokles relatívne vysoký, čo môžeme vysvetliť rýchlejšou syntézou polyméru ako štiepenia enzýmom BTH. V ôsmej hodine fermentácie, kedy sa končila exponenciálna fáza rastu buniek a začala sa spomaľovať syntéza HA, sa v pokuse bez prídavku enzýmu koncentrácia rozpusteného kyslíka nemenila. V druhom prípade môžeme vďaka zníženiu viskozity činnosťou hyaluronidáz sledovať mierny nárast koncentrácie rozpusteného kyslíka od 8. do 13. hodiny fermentácie. Z rastovej krivky mikroorganizma (Obr. 2.6) je zjavné, že v 13. hodine bola rýchlosť množenia buniek nulová a rýchlosť syntézy HA veľmi nízka. V experimente s prídavkom 1 000 U enzýmu môžeme od 13. do 16. h fermentácie príspevok k poklesu rozpusteného kyslíka pripísať vplyvu činnosti hyaluronidáz, vďaka ktorej sa zvýšila až na hodnotu takmer 30 %. Počas posledných dvoch hodín fermentácie (14. – 16. h) sa mikroorganizmy nachádzali vo fáze odumierania a ich syntéza HA bola nulová, preto pri prvom pokuse bez prídavku enzýmu môžeme tiež sledovať mierny nárast koncentrácie rozpusteného kyslíka, ktorý je spôsobený jeho nižšou spotrebou bunkami.



■ Temp °C
 ■ Stirrer 1/min
 ■ pH pH
 ■ pO2 %
 ■ Flow l/min

Obr. 4.9: Výstup z fermentora – priebehy zmien v hodnotách jednotlivých parametrov fermentácie.

Zhora: bez prídavku enzýmu, po prídavku 1 000 U (BTH) / g (HA) v 0 h fermentácie. Žltou – teplota [°C], červenou frekvencia miešania [1/min], zelenou pH, modrou rozpustený kyslík [%] a ružovou prietok vzduchu [l/min]

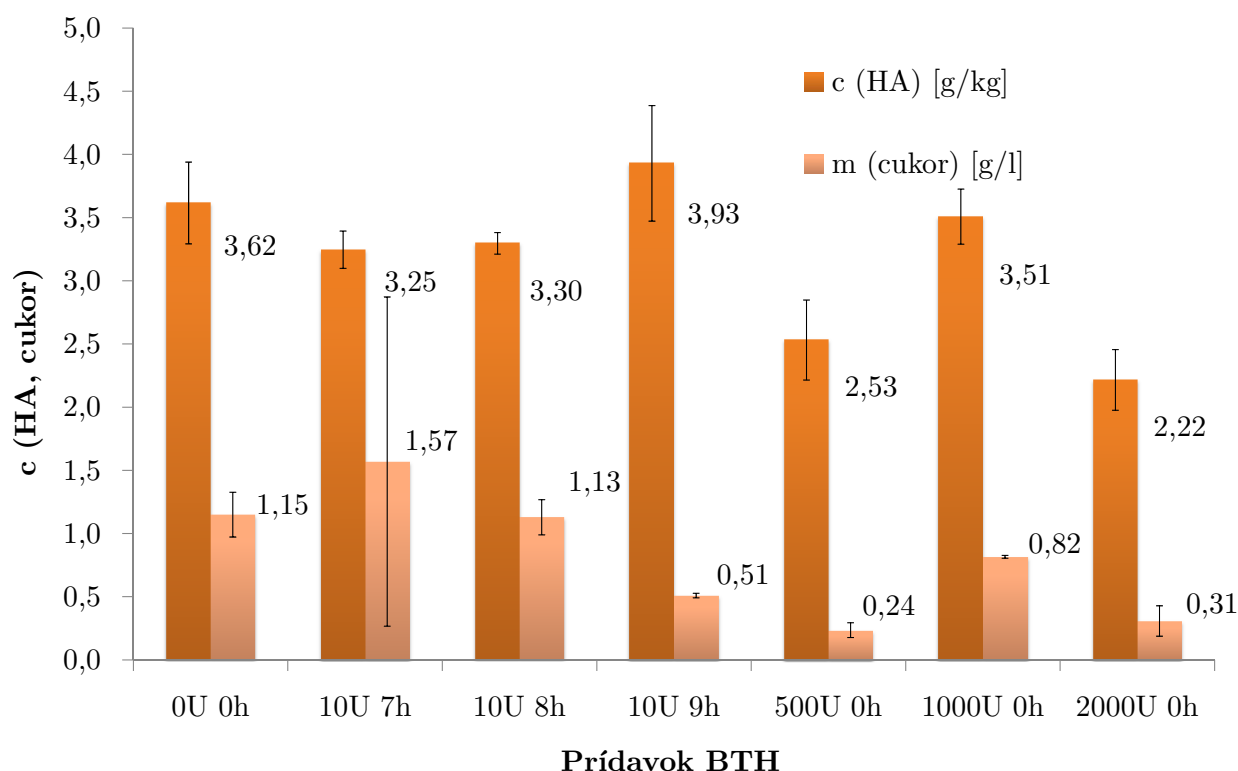
4.4 Výťažok HA

Vďaka analýze prestupu kyslíka bolo zistené, že v prípade prídavku 1 000 jednotiek enzýmu boli podmienky fermentácie výrazne priaznivejšie počas takmer piatich hodín. Napriek tomu nebol predpoklad pre zvýšenie výťažku prídavkom hyaluronidázy potvrdený v žiadnom z pokusov.

V štúdiu pri fermentácii *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, ktorou sa zaoberal Liu a kol. , (Tab. 2.1) vzrástol výťažok prídavkom hyaluronidázy z 5,0 na 6,0 g/l. Počiatočná koncentrácia sacharózy bola 70 g/l. Pri experimentoch bez prídavku enzýmu klesla na 8,6 g/l, s prídavkom enzýmu klesla až na 3,1 g/l [11].

V našom experimente bola počiatočná koncentrácia sacharózy iba 40 g/l, koncentrácia zbytkovej glukózy bola vo všetkých prípadoch veľmi nízka (v rozmedzí od 1,54 do 0,24 g/l), čo je pozitívne pre technologickú výťažnosť HA a zjednodušenie jej purifikácie, ale prípadný nárast výťažku HA by bol pomerne ťažko detekovateľný.

Liu a kol. vo svojej štúdiu dokázal kritickú hodnotu koncentrácie rozpusteného kyslíka pre produkciu HA, ktorá činí 5 %. Ďalšie zvyšovanie koncentrácie rozpusteného kyslíka nemá na výrobu HA žiaden vplyv. V našom prípade bola koncentrácia rozpusteného kyslíka pri fermentácii (Obr. 4.9) bez prídavku enzýmu iba trochu nižšia ako 5 %, po prídavku 1 000 jednotiek enzýmu už kritickú hodnotu mierne presiahla. Prípadný nárast výťažku by tak mohol byť zanedbateľný a rozdiely pri experimentoch s 10 U enzýmu sú spôsobené najskôr odchýlkami jednotlivých kultívácií.



Obr. 4.10: Závislosť množstva vzniknutej HA a koncentrácie zvyškovej glukózy.

Na obrázku 4.10 bola v prípade východiskovej kultivácie a po prídavku 10 U (BTH) / g (HA) v 7. – 9. h kultivácie medzi koncentráciou vzniknutej HA a zvyškovej glukózy potvr-

dená korelácia – pri vyššom výťažku HA bol zaznamenaný pokles koncentrácie zvyškovej glukózy a pri nižšom jej nárast. Tento trend nebol uplatnený práve pri prídavku rádovo vyšších koncentrácií enzýmu.

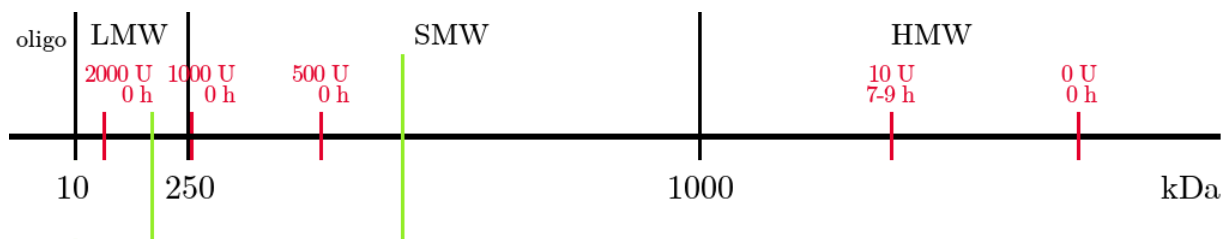
Keďže po prídavkoch 500 – 2 000 U enzýmu došlo nepochopiteľne k výraznému poklesu výťažku HA, overili sme si účinnosť nami prevedeného postupu zrážania pre nízkomolekulárnu HA (Tab. 4.1). Pokus pre zistenie účinnosti zrážania HA o rôznej molekulovej hmotnosti bol modelovaný tak, aby koncentračne aj pomerovo približne odpovedal nášmu spôsobu gravimetrického stanovenia opísanému v sekcii 3.3.6, zvolená koncentrácia HA však činila 5 g/l, čo je v porovnaní s priemernou koncentráciou HA v produkčnom médiu nepatrne vyššia pre lepšiu viditeľnosť.

Roztok HA 200 ml		Prídavok 400 ml 100% IPA	
M_w [kDa]	Zrazenina, sedimentácia	Roztok nad zrazeninou	
1 250 – 1 000	jemné vločky	čírý	
500 – 300	jemné vločky, pomalšia sedimentácia	čírý	
350 – 120	zrazenina na stenách	mierne zakalený	
120 – 70	mazľavá zrazenina na dne	zakalený	
70 – 50	mazľavá zrazenina na dne	zakalený	
50 – 30	mazľavá zrazenina na dne	zakalený	

Tab. 4.1: Pozorovanie účinnosti zrážania HA o známej M_w obvyklým spôsobom gravimetrického stanovenia výťažku

Pri zrážaní HA v rozmedzí molekulovej hmotnosti 500 – 1 250 kDa sa na stenách kadičky nezachytili žiadne vločky a roztok nad sedimentom bol úplne priehľadný. Pri rozmedzí molekulovej hmotnosti 300 – 500 kDa bol roztok nad zrazeninou čírý napriek pomalšej sedimentácii. Od molekulovej hmotnosti 300 kDa môžeme predpokladať úplné vyzrážanie produktu. Zrazenina HA o molekulovej hmotnosti 120 – 350 kDa sa nachádzala okrem dna nádoby aj na stenách a výška vrstvy sedimentu bola väčšia ako v pokusoch s vyššou molekulovou hmotnosťou. Roztok nad zrazeninou bol mierne zakalený, voľným okom však nebolo možné rozoznať veľkosť vločiek. Z tohto pokusu môže byť usúdené, že pri vzniku HA o molekulovej hmotnosti nižšej ako 300 kDa dochádza ku jej čiastočnému odplaveniu počas prvej dekantácie, tým aj ku strate výťažku. Od molekulovej hmotnosti HA nižšej ako 120 kDa nemala vzniknutá zrazenina tvar vločiek, HA vytvorila hustý gél na spodku nádoby a roztok nad ním bol mliečne biely. Pri molekulovej hmotnosti HA nižšej ako 120 kDa dochádza kvôli nedostatočnému vyzrážaniu a nízkej sedimentácii HA ku výraznej strate výťažku.

Na základe toho môžeme usúdiť, že v pokusoch pri prídavku 500 a 1 000 U enzýmu došlo ku čiastočnej strate výťažku a pri prídavku 2 000 U enzýmu bola strata veľmi výrazná (Obr. 4.11).



Obr. 4.11: Oplyvnenie výťažku HA metódou gravimetrického stanovenia

V rozmedzí zobrazenom zelenou bola dokázaná strata výťažku.

4.5 Polydisperzita HA a optimalizácia režimu prídavku enzýmu

Technicky najjednoduchším bol prídavok hneď po zaočkovaní fermentorov. Enzým mal väčšiu účinnosť, nebola potrebná kontrola funkčnosti peristaltických čerpadiel a neriskovala sa prípadná kontaminácia média počas prídavku.

Enzým	M_w [kDa]	PDI
0 U, 0 h	$1\,642 \pm 41$	$1,378 \pm 0,034$
10 U, 7 h	$1\,323 \pm 67$	$1,487 \pm 0,039$
10 U, 8 h	$1\,334 \pm 66$	$1,435 \pm 0,072$
10 U, 9 h	$1\,459 \pm 83$	$1,496 \pm 0,031$
500 U, 0 h	251 ± 62	$1,958 \pm 0,089$
1 000 U, 0 h	160 ± 24	$2,593 \pm 0,187$
2 000 U, 0 h	75 ± 17	— ¹

Tab. 4.2: Hodnoty polydisperzity PDI vzniknutej HA

¹ z technických príčin nebola hodnota zistená

V prípade 10 U bol enzým prídavaný v 7. – 9. h fermentácie, teda v čase, kedy sa v médiu vysokomolekulárna HA už nachádzala. Hodnoty PDI sa prídavkom enzýmu mierne zvýšili v porovnaní s východiskovou kultiváciou. Prídavok 500 – 1 000 U enzýmu bol uskutočnený na začiatku fermentácie. Už prvé biopolyméry vytvorené HA-syntázou boli okamžite štiepené pridaným enzýmom. V tomto čase museli kvôli malému množstvu substrátu vzniknúť veľmi krátke fragmenty HA, ktoré mali veľký vplyv na hodnoty M_w a M_n , preto môžeme pozorovať aj vyššie hodnoty PDI. Väčší rozptyl molekulových hmotností je spôsobený hlavne časom jeho prídavku.

V štúdiu, ktorú uskutočnil Liu a kol., (Tab. 2.1) mal zvýšený prídavok enzýmu vplyv práve na pokles indexu polydisperzity. V ich experimente bol enzým prídavaný v ôsmej hodine fermentácie a vznik HA o M_w 200 kDa znamenal pokles PDI na 1,5 [11].

V našom prípade (Tab. 4.2) bol enzým prídavaný na začiatku fermentácie a pri vzniku HA o M_w 251 a 160 kDa bol zaznamenaný nárast PDI na 2,0 a 2,6 – ďalším zvyšovaním koncentrácie prídavku enzýmu narastal aj index polydisperzity vzniknutej HA. Na rozdiel

od vyššie zmieneného experimentu, v ktorom index polydisperzity klesal pri prídavku vyšších koncentrácií enzýmu, nami prevedenými experimentmi sa šírka distribúcie MW pri vyššej koncentrácii BTH zväčšovala. Tento principiálny rozdiel môžeme vysvetliť práve časom prídavku enzýmu.

V štúdií, ktorej sa venoval Jin a kol. (Tab. 2.2) stanovili rastúce hodnoty PDI zvyšovaním aktivity hyaluronidázy. Tento experiment bol uskutočnený prítokovou kultiváciou s bohatým zdrojom uhlíka a enzým bol exprimovaný mikroorganizmom v priebehu kultivácie, čo malo za následok rastúcu aktivitu enzýmu v čase kultivácie [61].

Trend zvyšovania hodnoty PDI rastúcou aktivitou enzýmu bol rovnaký ako v našom prípade, distribúcia M_w kyseliny hyaluronovej, ktorú pripravil Jin a kol., (Tab. 2.2) je v porovnaní s našou (Tab. 4.2) omnoho užšia. Aktivita enzýmov v médiu rástla postupne, náš enzým bol plne aktívny hneď od začiatku kultivácie. Fermentácia v prípade Jin a kol. navyše trvala 60-100 h, čo oproti našej 16 hodinovej kultivácii predstavuje omnoho dlhší čas pre ustanovenie rovnováhy.

Pre vznik úzkejšie špecifikovaných rozmedzí molekulových hmotností HA by mohlo byť účinné vykonať pokusy s vysokými koncentraciami enzýmu pridávanými v rôznych časoch strednej fáze fermentácie, kedy je v médiu dostatok substrátu pre enzým a, s prihliadnutím na náhodnosť jeho štiepenia, nižšia pravdepodobnosť vytvorenia širokého spektra molekulových hmotností.

5 ZÁVER

V tejto práci sa podarilo nájsť spôsob získania HA o rôznych molekulových hmotnostiach a optimalizovať režim prídavku enzýmu.

Prídavok 10 U enzýmu v 7. – 9. h fermentácie má za následok mierny pokles molekulovej hmotnosti HA a nárast indexu polydisperzity. Pri koncentráciách enzýmu 500 – 1 000 U pridaných na začiatku fermentácie boli stanovené hodnoty PDI vysoké (1,958 – 2,593). To je dané aktivitou hyaluronidáz už od začiatku fermentácie, kedy dochádza kvôli nedostatku substrátu ku výraznej fragmentácii, čo má za následok veľkú distribúciu M_w . Pre jej zníženie je potrebné pridať vysoké koncentrácie enzýmu v strednej časti fermentácie.

Ďalej bola dokázaná modifikácia molekulovej hmotnosti HA množstvom prídavku BTH v rôznom čase priebehu fermentačného procesu. Po prídavku 10 jednotiek enzýmu v siedmej hodine kultivácie bol pokles M_w viditeľný, vznikali však ešte vysokomolekulárne útvary rovnako ako pri východiskovej kultivácii. Dynamická viskozita klesla z pôvodných 219,7 mPa·s na 103,9 mPa·s. Tento pokles by mohol zjednodušiť náročné purifikačné procesy pri výrobe HA bez zmeny jej funkcie na základe molekulovej hmotnosti. Prestup kyslíka dosahoval takmer kritickú hodnotu pre produkciu HA už vo východiskovej kultivácii, preto zvýšenie výťažku pozorované nebolo. Po pridaní 2 000 jednotiek BTH na gram vyprodukovanej HA vznikala nízkomolekulárna HA a prídavkom 500 a 1 000 jednotiek enzýmu sme získali HA o strednej molekulovej hmotnosti. Viskozita média bola vo všetkých troch prípadoch priaznivo nízka, bol dokázaný aj lepší prestup kyslíka počas fermentácie. Pokles výťažku HA po prídavku 500 – 1 000 U nastal kvôli nízkej koncentrácii IPA pri procese zrážania nízkomolekulárnej HA, výťažok bol čiastočne odplavený pri prvej dekantácii. V ďalšom pokračovaní výskumu je potrebné upraviť gravimetrický spôsob stanovenia výťažku zvýšením koncentrácie IPA.

ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] Hyaluronic acid, *Worthington biochemical corporation* [online]. [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://worthington-biochem.com/VHHA/default.html>
- [2] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, **53**(8), 397-411.
- [3] MONSLOW, James, Priya GOVINDARAJU, Ellen PURÉ, et al., 2015. Hyaluronan – a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Frontiers in Immunology*. **6**, -. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00231. ISSN 1664-3224.
- [4] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOORY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK, 2013. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. **2013**, 1-14. DOI: 10.1155/2013/624967. ISSN 1687-9341.
- [5] SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE, Christopher A. LOVE, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK, 2016. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*. **6**(1), -. DOI: 10.1007/s13205-016-0379-9. ISSN 2190-572x.
- [6] MAYOL, Laura, Marco BIONDI, Luisa RUSSO, Birgitte M. MALLE, Khadija SCHWACH-ABDELLAOUI a Assunta BORZACCHIELLO, 2014. Amphiphilic hyaluronic acid derivatives toward the design of micelles for the sustained delivery of hydrophobic drugs. *Carbohydrate Polymers*. **102**, 110-116. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.11.003. ISSN 01448617.
- [7] CHOI, Ki Young, Gurusamy SARAVANAKUMAR, Jae Hyung PARK a Kinam PARK, 2012. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **99**, 82-94. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.029. ISSN 09277765.
- [8] SHIN, Jung Min, Seung Rim HWANG, Roun HEO, G. SARAVANAKUMAR a Jae Hyung PARK, 2014. Amphiphilic hyaluronic acid derivative with the bioreducible bond: Synthesis and its implication for intracellular drug delivery. *Polymer Degradation and Stability*. **109**, 398-404. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.05.003. ISSN 01413910.
- [9] STERN, Robert, Grigorij KOGAN, Mark J. JEDRZEJAS a Ladislav ŠOLTÉS, 2007. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*. **25**(6), 537-557. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00101. ISSN 07349750.
- [10] PETREY, Aaron C. a Carol A. DE LA MOTTE, 2014. Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Frontiers in Immunology*. **5**, -. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00101. ISSN 1664-3224.

- [11] LIU, Long, Guocheng DU, Jian CHEN, Maio WANG a Jun SUN, 2008. Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* *Food Chemistry*. **110**(4), 923-926. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.02.082. ISSN 03088146.
- [12] JIANG, Dianhua, Jiurong LIANG a Paul W. NOBLE, *Hyaluronan in Tissue Injury and Repair*. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337. ISBN 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337.
- [13] COLEMAN, P. J., D. SCOTT, R. M. MASON a J. R. LEVICK, 1999. Characterization of the effect of high molecular weight hyaluronan on trans-synovial flow in rabbit knees. *The Journal of Physiology*. **514**(1), 265-282. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.265af.x. ISSN 00223751.
- [14] WANG, Tao, Hui-Hong CHENG, Olof HEIMBÜRGER, Chi CHEN, Jacek WANIĘSKI, Jonas BERGSTRÖM a Bengt LINDHOLM, *Hyaluronan decreases peritoneal fluid absorption: Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan*. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00279.x. ISBN 10.1046/j.1523-1755.1999.00279.x.
- [15] CHOPRA, Anant, Maria E. MURRAY, Fitzroy J. BYFIELD, et al., 2014. *Augmentation of integrin-mediated mechanotransduction by hyaluronic acid*. *Biomaterials*. **35**(1), 71-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.066. ISSN 01429612.
- [16] TRAVIS, J. A., M. G. HUGHES, J. M. WONG, W. D. WAGNER a R. L. GEARY, *Hyaluronan Enhances Contraction of Collagen by Smooth Muscle Cells and Adventitial Fibroblasts: Role of CD44 and Implications for Constrictive Remodeling*. DOI: 10.1161/01.RES.88.1.77. ISBN 10.1161/01.RES.88.1.77.
- [17] CHEN, Chien-Hsi, Shoei-Shen WANG, Erika IH WEI, Ting-Yu CHU a Patrick CHSIEH, 2013. Hyaluronan Enhances Bone Marrow Cell Therapy for Myocardial Repair After Infarction. *Molecular Therapy*. **21**(3), 670-679. DOI: 10.1038/mt.2012.268. ISSN 15250016.
- [18] BOURGUIGNON, Lilly Y.W., Gabriel WONG, Weiliang XIA, Mao-Qiang MAN, Walter M. HOLLERAN a Peter M. ELIAS, *Selective matrix (hyaluronan) interaction with CD44 and RhoGTPase signaling promotes keratinocyte functions and overcomes age-related epidermal dysfunction*. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.05.003. ISBN 10.1016/j.jdermsci.2013.05.003.
- [19] MUELLER, B. M., I. U. SCHRAUFSTATTER, V. GONCHAROVA, T. POVALIY, R. DISCIPIO a S. K. KHALDOYANIDI, *Hyaluronan Inhibits Post-chemotherapy Tumor Regrowth in a Colon Carcinoma Xenograft Model*. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0529. ISBN 10.1158/1535-7163.MCT-10-0529.
- [20] CHANMEE, Theerawut, Pawared ONTONG, Nobutoshi MOCHIZUKI, Prachya KONGTAWELERT, Kenjiro KONNO a Naoki ITANO, 2014. Excessive Hyaluronan Production Promotes Acquisition of Cancer Stem Cell Signatures through the

Coordinated Regulation of Twist and the Transforming Growth Factor β (TGF- β)-Snail Signaling Axis. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(38), 26038-26056. DOI: 10.1074/jbc.M114.564120. ISSN 0021-9258.

- [21] TERMEER, C. C., J. HENNIES, U. VOITH, T. AHRENS, J. M. WEISS, P. PREHM a J. C. SIMON, *Oligosaccharides of Hyaluronan Are Potent Activators of Dendritic Cells*. DOI: 10.4049/jimmunol.165.4.1863. ISBN 10.4049/jimmunol.165.4.1863.
- [22] SYLVESTER, Andrew, Balakrishnan SIVARAMAN, Partha DEB a Anand RAMAMURTHI, 2013. Nanoparticles for localized delivery of hyaluronan oligomers towards regenerative repair of elastic matrix. *Acta Biomaterialia*. **9**(12), 9292-9302. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.032. ISSN 17427061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113003802>
- [23] TOLG, Cornelia, Patrick TELMER, Eva TURLEY a Partha MUKHOPADHYAY, 2014-2-13. Specific Sizes of Hyaluronan Oligosaccharides Stimulate Fibroblast Migration and Excisional Wound Repair. *PLoS ONE*. **9**(2), e88479-. DOI: 10.1371/journal.pone.0088479. ISSN 1932-6203.
- [24] GAO, Feng, Yiwen LIU, Yiqing HE, Cuixia YANG, Yingzhi WANG, Xiaoxing SHI a Guo WEI, 2010. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biology*. **29**(2), 107-116. DOI: 10.1016/j.matbio.2009.11.002. ISSN 0945053x.
- [25] DANG, Shipeng, Yongde PENG, Lei YE, et al., 2013. Stimulation of TLR4 by LMW-HA Induces Metastasis in Human Papillary Thyroid Carcinoma through CXCR7. *Clinical and Developmental Immunology*. **2013**, 1-11. DOI: 10.1155/2013/712561. ISSN 1740-2522.
- [26] KUJAWA, Mary J. a Arnold I. CAPLAN, *Hyaluronic acid bonded to cell-culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cell cultures*. -. DOI: 10.1016/0012-1606(86)90214-9. ISBN 10.1016/0012-1606(86)90214-9.
- [27] KOUVIDI, K., A. BERDIAKI, D. NIKITOVIC, P. KATONIS, N. AFRATIS, V. C. HASCALL, N. K. KARAMANOS a G. N. TZANAKAKIS, 2011. Role of Receptor for Hyaluronic Acid-mediated Motility (RHAMM) in Low Molecular Weight Hyaluronan (LMWHA)-mediated Fibrosarcoma Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. **286**(44), 38509-38520. DOI: 10.1074/jbc.M111.275875. ISSN 0021-9258.
- [28] YANG, Tianbing, TIMOTHY, Timothy F. WITHAM, Melanie ERFF, Jason ATTANUCCI a Simon WATKINS, 2002. Glioma-associated Hyaluronan Induces Apoptosis in Dendritic Cells via Inducible Nitric Oxide Synthase. *Cancer Research*. **62**(25), 83-91.
- [29] O'REGAN, Michael, Irene MARTINI, Fabiana CRESCENZI, Claudio DE LUCA a Manfred LANSING, 1994. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **16**(6), 283-286. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90056-6. ISSN 01418130.

- [30] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE, 2010. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. Biopolymers. Sciyo. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1.
- [31] BALASZ, Endre A., *Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof*. USA. 4141973. Udelené 27.2.1979. Zapísané 25.10.1977.
- [32] MURADO, M.A., M.I. MONTEMAYOR, M.L. CABO, J.A. VÁZQUEZ a M.P. GONZÁLEZ, 2012. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bioprocess Processing*. **90**(3), 491-498. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.11.002. ISSN 09603085.
- [33] KHANMOHAMMADI, Mehdi, Ali Baradar KHOSHFETRAT, Shahla ESKANDAR-NEZHAD, Najimeh Feyze SANI a Sirus EBRAHIMI, 2014. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **20**(6), 4371-4376. DOI: 10.1016/j.jiec.2014.02.001. ISSN 1226086x.
- [34] DEANGELIS, P. L., Leonard C. OATMAN a Daniel F. GAY, 2003. Rapid Chemo-enzymatic Synthesis of Monodisperse Hyaluronan Oligosaccharides with Immobilized Enzyme Reactors. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(37), 35199-35203. DOI: 10.1074/jbc.M306431200. ISSN 0021-9258.
- [35] KOOY, Floor K., 2010. *Enzymatic production of hyaluronan oligo- and polysaccharides*. The Netherlands. PhD thesis. Wageningen University.
- [36] KAUR, Mandeep a Guhan JAYARAMAN, 2016. Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis*. *Metabolic Engineering Communications*. **3**, 15-23. DOI: 10.1016/j.meten.2016.01.003. ISSN 22140301.
- [37] SONG, Adelene Ai-Lian, Lionel L. A. IN, Swee Hua Erin LIM a Raha Abdul RAHIM, 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*. **16**(1), -. DOI: 10.1186/s12934-017-0669-x. ISSN 1475-2859.
- [38] DE OLIVEIRA, Juliana Davies, Lucas Silva CARVALHO, Antônio Milton Vieira GOMES, Lúcio Rezende QUEIROZ, Beatriz Simas MAGALHÃES a Nádia Skorupa PARACHIN, 2016. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*. **15**(1), -. DOI: 10.1186/s12934-016-0517-4. ISSN 1475-2859.
- [39] WIDNER, B., R. BEHR, S. VON DOLLEN, et al., 2005. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(7), 3747-3752. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005. ISSN 0099-2240.
- [40] RUFFING, A. M., M. CASTRO-MELCHOR, W.-S. HU a R. R. CHEN, 2011. Genome Sequence of the Curdlan-Producing *Agrobacterium* sp. Strain ATCC 31749. *Journal of Bacteriology*. **193**(16), 4294-4295. DOI: 10.1128/JB.05302-11. ISSN 0021-9193.

- [41] CHEN, W. Y., E. MARCELLIN, J. HUNG a L. K. NIELSEN, 2009. Hyaluronan Molecular Weight Is Controlled by UDP-N-acetylglucosamine Concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biological Chemistry*. **284**(27), 18007-18014. DOI: 10.1074/jbc.M109.011999. ISSN 0021-9258.
- [42] BLANK, Lars M., Philip HUGENHOLTZ a Lars K. NIELSEN, 2008. Evolution of the Hyaluronic Acid Synthesis (has) Operon in *Streptococcus zooepidemicus* and Other Pathogenic *Streptococci*. *Journal of Molecular Evolution*. **67**(1), 13-22. DOI: 10.1007/s00239-008-9117-1. ISSN 0022-2844.
- [43] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jianghua LI, Guocheng DU a Jian CHEN, 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. **10**(1), 99-. DOI: 10.1186/1475-2859-10-99. ISSN 1475-2859
- [44] ZAKERI, Alireza a Mohammad RASAEI, 2016. Identification of Wild Type *Streptococcus Zooepidemicus* and Optimization of Culture Medium and Fermentation Conditions for Production of Hyaluronic Acid. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. **13**(1), 189-198. DOI: 10.13005/bbra/2022. ISSN 09731245.
- [45] CRATER, D. L., B. A. DOUGHERTY a I. VAN DE RIJN. Molecular Characterization of hasC from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A *Streptococci* DEMONSTRATION OF UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(48), 28676-28680 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1074/jbc.270.48.28676. ISSN 0021-9258.
- [46] ARMSTRONG, D. C., M. J. COONEY a M. R. JOHNS. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1997-3-21, **47**(3), 309-312 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1007/s002530050932. ISSN 0175-7598.
- [47] CHONG, B a L NIELSEN. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2003, **100**(1), 33-41 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/S0168- 1656(02)00239-0. ISSN 01681656.
- [48] LIU, Long, Guocheng DU, Jian CHEN, Miao WANG a Jun SUN. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(17), 8532-8536 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.02.035. ISSN 09608524.
- [49] LIU, L., M. WANG, G. DU a J. CHEN, 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*. **46**(3), 383-388. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x. ISSN 0266-8254.

- [50] SHAH, Mihir V., Sneha S. BADLE a K.B. RAMACHANDRAN, 2013. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochemical Engineering Journal*. **80**, 53-60. DOI: 10.1016/j.bej.2013.09.013. ISSN 1369703x.
- [51] WU, Ting-Feng, Wei-Chih HUANG, Yi-Chun CHEN, Yeou-Guang TSAY a Chun-Sheng CHANG. Proteomic investigation of the impact of oxygen on the protein profiles of hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *PROTEOMICS* [online]. 2009, **9**(19), 4507-4518 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1002/pmic.200800868. ISSN 16159853.
- [52] JAGANNATH, Swaminathan a K.B. RAMACHANDRAN. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2010, **48**(2), 148-158 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.003. ISSN 1369703x.
- [53] ZHANG, Xu, Xu-Jie DUAN a Wen-Song TAN. Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(4), 1643-1646 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.014. ISSN 03088146.
- [54] WON, Teug Yeon, Chung LEE a Sang Hyoun SEO, *Method for purifying hyaluronic acid*. WO2008062998 A1. Udelené 29.5.2008. Zapsané 21.11.2007.
- [55] EL-SAFORY, Nermeen S., Ahmed E. FAZARY a Cheng-Kang LEE, 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. **81**(2), 165-181. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.02.047.
- [56] Hyaluronidase. Lyophilized powder form: Supplier: MP Biomedicals, VWR [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://us.vwr.com/store/product/14511596/hyaluronidase-lyophilized-powder-form>
- [57] WEBB, Edwin C., c1992. *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. San Diego: Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press. ISBN 01-222-7164-5.
- [58] SCHOMBURG, D. a M. SALZMAN, 1994. *Enzyme handbook*. 2nd ed. Berlin u.a: Springer. ISBN 35-405-2579-3.
- [59] SCHATTEN., Heide, ed., 2004. *Germ cell protocols* [online]. Totowa, N.J: Humana Press [cit. 2017-04-30]. ISBN 978-159-2597-413.
- [60] Enzymová kinetika: Faktory ovlivňující enzymové reakce, *Institut Galenus* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-biokatalyza-enzymova-kinetika>

- [61] JIN, Peng, Zhen KANG, Panhong YUAN, Guocheng DU a Jian CHEN, 2016. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*. **35**, 21-30. DOI: 10.1016/j.ymben.2016.01.008. ISSN 10967176.
- [62] SNYDER, Lloyd R., 1979. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2. ed. New York: John Wiley. ISBN 04-710-3822-9.
- [63] MORI, Sadao a Howard G. BARTH, c1999. *Size exclusion chromatography*. New York: Springer. ISBN 978-354-0656-357.
- [64] Molecular Weight of Polymers, Open stax CNX [online]. [cit. 2017-04-08]. Dostupné z: <http://cnx.org/contents/7L7IPqq0@1/Molecular-Weight-of-Polymers>
- [65] A Question of Molecular Weight, *American Polymer Standards Corporation* [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.ampolymer.com/AQuestionofMolecularWeight.html>
- [66] Molar mass of polymers, *University of Akron* [online]. [cit. 2017-04-30].
- [67] BARHAM, Denise a P. TRINDER, 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *The Analyst*. **97**(1151), 142-. DOI: 10.1039/an9729700142. ISSN 0003-2654.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

Symbol	Popis
ATP	adenozíntrifosfát
BTH	Bovite Testine Hyaluronidase (Bovinná hyaluronidáza)
ECM	extracelulárna matrix
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
GlcNAc	N-acetyl-glukóзамín
GlcUA	glukurónová kyselina
GlmM	enzým, mutáza
GlmS	enzým, amidotransferáza
GPC	Gélová Permeačná Chromatografia
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering (Detektor rozptylu svetla)
GRAS	Generally recognized as safe (Všeobecne považované za bezpečné)
HA	kyselina hyalurónová
HAS	enzým, hyalurónan syntáza
hasA	operón, hyalurónan syntáza
hasB	operón, UDP-glukóza dehydrogenáza
hasC	operón, UDP-glukóza pyrofosforyláza
hasD	operón, acetyltransferáza
hasE	operón, fosfoglukoizomeráza
HEMA	hydroxyetylmetakrylát
hm. %	hmotnostné percento
HMW	vysokomolekulárny
Hyal	hyaluronidáza
Hyals	hyaluronidázy
LHyal	Leech Hyalurnidase (hyaluronidáza z pijavíc)
LMW	nízkomolekulárny
MMW	strednej molekulovej hmotnosti

Symbol	Popis
MW	molekulová hmotnosť
ldh	laktát dehydrogenáza
M_n	číselný priemer molekulovej hmotnosti
M_w	hmotnostný priemer molekulovej hmotnosti
M_z	"z"-priemer molekulovej hmotnosti
NOX	oxidy dusíka
oligo-HA	oligosacharidy kyseliny hyalurónovej
PDI	polydisperzita
Pgm	fosfoglycerát mutáza
pmHAS	hyaluronan syntáza z mikroorganizmu <i>Pasturella</i>
SDS	dodecylsírán sodný
SEC	Size – exclusion chromatography (Vylučovacia chromatografia)
<i>S. z.</i>	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
U (BTH) / g (HA)	jednotky enýmu BTH vzťahnuté na gram vyprodukovanej kyseliny hyalurónovej
UDP	uridín difosfát

ZOZNAM OBRÁZKOV

2.1	Chemická štruktúra kyseliny hyaluronovej.	13
2.2	Zhrnutie patologického významu veľkostí HA <i>in vivo</i>	16
2.3	Metódy produkcie hyaluronanu.	18
2.4	Biosyntetická dráha kyseliny hyaluronovej.	22
2.5	Vzťah medzi bunkovým rastom, syntézou kyseliny hyaluronovej a akumu- láciou laktátu.	24
2.6	Časový priebeh parametrov fermentácie.	25
2.7	Význam jednotlivých mólových hmotností v distribúčnej krivke.	30
4.1	Grafy zmien dynamickej viskozity roztokov hyaluronanu v čase po prídavku 10 – 1 000 U (BTH) / g (HA)	41
4.6	Závislosť viskozity HA v produkčnom médiu na množstve a čase pridaného enzýmu.	44
4.7	Závislosť molekulovej hmotnosti vzniknutej HA na množstve a čase prida- ného enzýmu.	45
4.8	Zaradenie vzniknutých biopolymérov HA do rozmedzí molekulových hmot- ností.	46
4.9	Výstup z fermentora – priebehy zmien v hodnotách jednotlivých paramet- rov fermentácie.	47
4.10	Závislosť množstva vzniknutej HA a koncentrácie zvyškovej glukózy.	48
4.11	Ovplyvnenie výťažku HA metódou gravimetrického stanovenia	50

ZOZNAM TABULIEK

2.1	Vplyv prídavku hyaluronidázy na fermentáciu <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	28
2.2	Vplyv prídavku hyaluronidázy na fermentáciu <i>Bacillus subtilis</i>	29
3.1	Suroviny na prípravu 1 l živného média E1	35
3.2	Zloženie komerčného roztoku R	37
3.3	Objem jednotlivých roztokov pre analýzu zbytkovej sacharózy	37
4.1	Pozorovanie účinnosti zrážania HA o známej M_W obvyklým spôsobom gravimetrického stanovenia výťažku	49
4.2	Hodnoty polydisperzity PDI vzniknutej HA	50